مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية

المنظمة العربية للترجمة

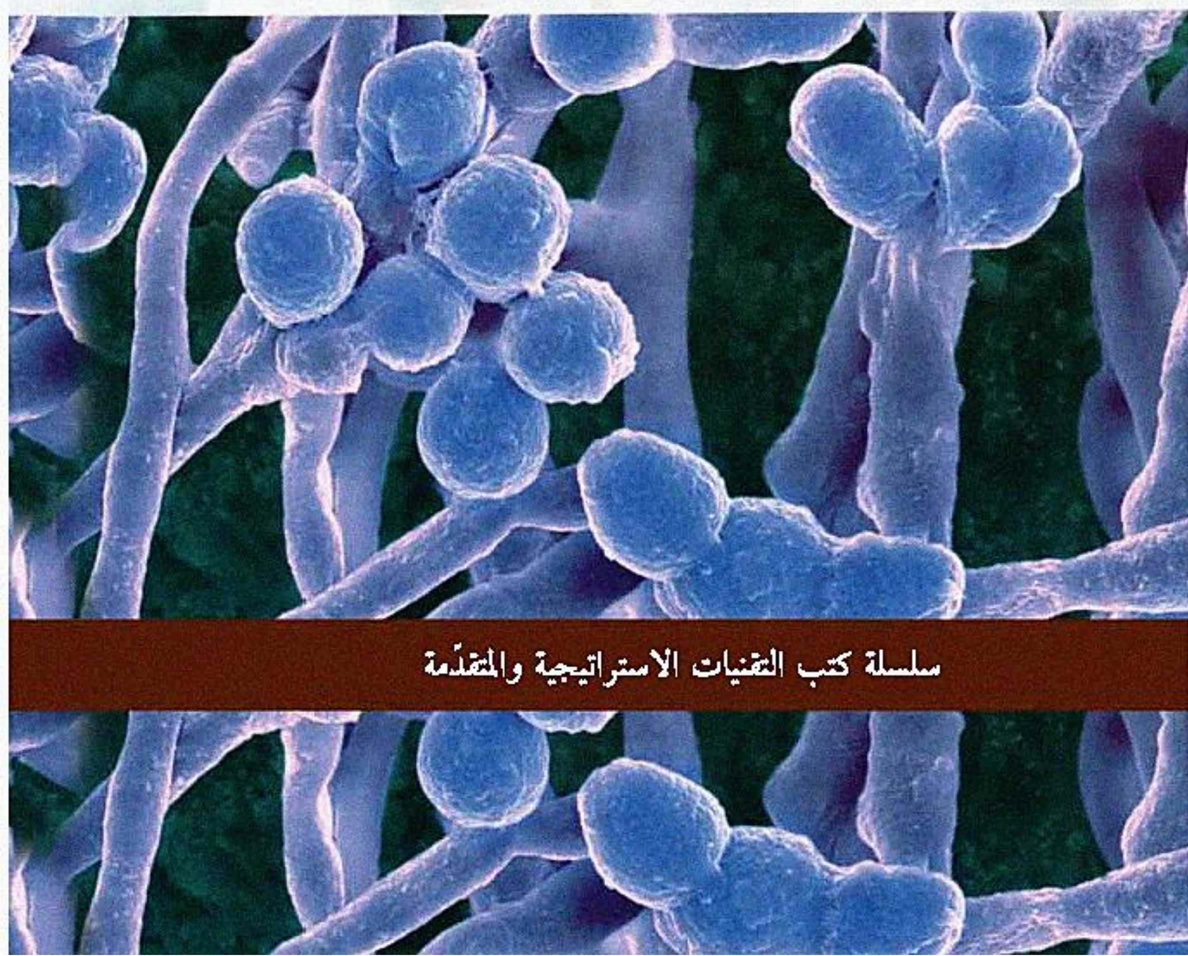
كولن راتليج

بيورن كريستيانسن

أسس التقانة الحيوية

ترجمة

د. ابتسام عبد الجبار   د. غالب البكري   د. إياد غانم



سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدّمة

تمهيــد
أسس التقانة الحيوية

تُعتبر التقانة الحيوية من أهم منجزات القرن الحادي والعشرين، إذ إنها تشتمل على مجالات متنوعة كتهجين أو دمج أو تأشيب الـ DNA (Recombinant DNA) وكلونته (Cloning) واستنساخ أو كلونة الكائنات متعددة الخلايا (Multicellular organism cloning)، كما تشتمل التقانة الحيوية على تطبيقات شتى في مجال علم الأحياء المجهرية (Microbiology) ومجال زراعة الخلايا .(Cell culture) كما تتجلى أهمية التقانة الحيوية أيضاً في المجال الصناعي الواسع، من صناعة رغيف الخبز إلى إنتاج العقاقير كمضادات الحيوية، وتطوير علاجات لأمراض كثيرة، كما تجهد التقانة الحيوية في توفير الحلول للمشاكل البيئية المتعددة.

يقدم هذا المرجع «أسس التقانة الحيوية» دمجاً فريداً ومميزاً بين مواضيع العلوم البيولوجية البحتة ومواضيع العمليات الإنجازية الحيوية (Bioprocessing)، معطياً بذلك نظرة شمولية كاملة للتقانة الحيوية. كما يوضح هذا المرجع المبادئ الأولية التي بنيت عليها كل التقنيات الحيوية، ويعطي أمثلة عملية كثيرة على كيفية تطبيق هذه المبادئ، انطلاقاً من المادة الأولية الخام (Substrate) وحتى الوصول إلى المنتج النهائي. كما يتطرق نص هذا المرجع إلى مناقشة الآراء والانطباعات عن التقانة الحيوية وارتباطها في مجال الاقتصاد الواسع والأعمال، ما يضع العلوم في إطار أوسع من المجال الأكاديمي. لذلك تُعتبر قراءة هذا الكتاب الشامل ضرورة للطلاب والتقنيين العاملين في الميدان، والباحثين والأكاديميين والعاملين في معاهد الأبحاث والمصانع التي تعتمد التقانة الحيوية .

السيد كولن راتليج (Colin Ratledge)، بروفيسور متقاعد، لكنه ما زال

يمارس نشاطاً علمياً في قسم علوم الأحياء في جامعة هلّ (Hull) حيث أمضى قرابة أربعين عاماً من البحث والتدريس. لقد أدى البروفيسور راتليج خدمات في معظم هيئات التقانة الحيوية في المملكة المتحدة، ومن بينها ترؤسه لهيئة Food Research Grants Board التابع لـ Biotechnology and Biological Sciences Research Council، كما يعمل البروفيسور راتلدج مستشاراً لدى شركات صناعية كبرى في بريطانيا وأوروبا والولايات المتحدة الأمريكية.

يشغل السيد بيورن كرستيانسن (Bjorn Kristiansen) منصب الرئيس التنفيذي للهيئة الأوروبية لاستشارات التقانة الحيوية في النرويج. كما يقوم السيد كرستيانسن بدور عضو ناشط في الفيدرالية الأوروبية للتقانة الحيوية، وهو أحد مؤسسي قسم علوم هندسة التقانة الحيوية ويشغل منصب رئيس مؤقت.

قائمة بأسماء المؤلفين

Alistair J. Anderson

Department of Biological Sciences, University of Hull, Hull, HU6

7RX, UK

David B. Archer

School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, UK

Frank Baganz

The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London, Torrington Place, London, WC1E 7JE, UK

Randy M. Berka

Research Fellow, Core Technology Department, Novozymes Biotech, Inc., 1445 Drew Avenue, Davis, CA 95616, USA

Joaquim M. S. Cabral

Centro de Engenharia, Bioquimica e Quimica, Av Rovisco Pais, Instituto Superior Technico, 1049–001 Lisboa, Portugal

Joel R. Cherry

Novozymes Biotech, Inc., 1445 Drew Avenue, Davis, CA 95616, USA

Yusuf Chisti

Institute of Technology and Engineering, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand

Mike Clark

Division of Immunology, Department of Pathology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QP, UK

Steven D. Doig

The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London, Torrington Place, London, WC1E 7JE, UK

L. Eggeling

Research Centre Julich, Biotechnologie 1, 52425 Jülich, Germany

Sven-Olof Enfors

Department of Biochemistry and Biotechnology, Riayl Institute of Technology, S-100 44 Stockholm, Sweden

Sir Christopher Evans

Merlin Biosciences Ltd, 33 King Street, St James, London, SW1Y 6RJ, UK

Pedro Fernandes

Centro de Engenharia, Bioquimica e Quimica, Av Rovisco Pais, Instituto Superior Technico, 1049–001 Lisboa, Portugal

Colin R. Harwood

Department of Microbiology and Immunology, The Medical School, University of Newcastle, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

J. J. Heijnen

TU Delft, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands

C. J. Hewitt

Department of Chemical Engineering (Biochemical Engineering), The University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, UK

Derek J. Hook

Senior Research Specialist, 3M Pharmaceuticals, Pharmacology, Building 0270-03-A10, 3M Center, St Paul, MN 55144-1000, USA

B. Isailovic

Department of Chemical Engineering (Biochemical Engineering), The University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, UK

David J. Jeenes

Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, UK

Levente Karaffa

Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Debrecen, H-4010, PO Box 63, Debrecen, Hungary

Georg-B. Kresse

Head of Protein Discovery, Pharma Research, Roche Diagnostics GmbH, D-82372 Penzberg, Germany

Bjørn Kristiansen

EU Biotech Consulting, Gluppeveien 15, 1614 Fredrikstad, Norway

Christian P. Kubicek

Division of Gene Technology, Institut fur Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Techn, Biowissenschaften, Getreidemarkt 9/166, A-Vienna 1060, Austria

Gary J. Lye

The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London, Torrington Place, London, WC1E 7JE, UK

Donald A. MacKenzie

Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, UK

N. T. Mukwena

Department of Chemical Engineering (Biochemical Engineering), The University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, UK

Jens Nielsen

Center for Process Biotechnology, Building 223, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark

A. W. Nienow

Department of Chemical Engineering (Biochemical Engineering), The University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, UK

Henk J. Noorman

DSM Anti-Infectives, PO Box 425, 2600 AK Delft, The Netherlands

Marcel Ottens

Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands

W. Pfefferle

Degussa AG, Feed Additives Division, R&D, Kantstraese 2, 33790 Halle-Kuensebeck, Germany

Colin Ratledge

Department of Biological Sciences, University of Hull, Hull, HU6 7RX, UK

Jason Rushton

Merlin Biosciences Ltd, 33 King Street, St James, London, SW1Y 6RJ, UK

H. Sahm

Research Centre Jülich, Biotechnologie 1, D-52425 Julich, Germany

J. E. Smith

Department of Bioscience and Biotechnology, University of Strathclyde, 204 George Street, Glasgow, G1 1XW, UK

Bernhard Sonnleitner

Zurich University of Applied Sciences, Winterthur, Institute for Chemistry and Biotechnology, Postfach 805, 8401 Winterthur, Switzerland

Hens J. G. ten Hoopen

Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands

Luuk A. M. van der Wielen

Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands

Philippe Vandevivere

The Seawater Foundation, 4230E. Whittier Street, Tucson, AZ 85711, USA

Robert Verpoorte

Department of Pharmacognosy, Section Metabolomics, IBL, Leiden University, Leiden, The Netherlands

Willy Verstraete

Laboratory for Microbial Ecology and Technology, Ghent University, Coupure L653, Belgium

Johannes A. Wesselingh

University of Groningen, Department of Chemical Engineering, Nijenborgh 4, Groningen, NL-9747 AG, The Netherlands

Anil Wipat

Department of Microbiology and Immunology, The Medical School, University of Newcastle, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

James P. Wynn

Martek Biosciences Corp., 6480 Dobbin Road, Columbia, Maryland, MD21045, USA

مقدمة الطبعة الثانية

منذ حوالى أربعة عشر عاماً ظهرت الطبعة الأولى لهذا الكتاب. لقد طرأت خلال تلك السنوات تطورات وتغيرات كثيرة في مجال التقانة الحيوية. فتقنية تأشيب الـ DNA على سبيل المثال، التي أعلنت ولادتها في منتصف الثمانينيات من القرن الماضي، تُعتبر الآن واحدة من أهم أركان التقانة الحيوية الحديثة. ولقد أدى التطور المذهل في هذا المجال إلى تغيير مفاهيم متعلقة بالرعاية الصحية، حيث أدت تلك التقنيات الجديدة إلى التوصل إلى منتجات عديدة ما كانت حتى لتخطر على البال من قبل. وإذا ما استمر التقدم على هذه الوتيرة، فيُتوقع في الأربعة عشر عاماً المقبلة حصول تغيرات وتطورات غاية في الأهمية، وذلك بفضل مشاريع عديدة كمشروع الجينوم البشري (Human Genome Project) على سبيل المثال الذي سيفتح فرصاً لتأمين علاج الأمراض على مستوى الفرد. هنا لا بد من التأكيد أن تلك التطورات تعتمد على تطبيق عملي لمفاهيم ومبادئ المعرفة الأساسية، وأنها تعتمد على البراعة في تحويل المعرفة الأساسية إلى منتج مفيد بأسلم الطرق وأقلها كلفة. لذلك كان الهدف الجوهري من التقانة الحيوية وسيبقى، تصنيع وإنتاج مواد وتأدية خدمات في مختلف المجالات، وذلك بأقل كلفة ممكنة وأسلم الطرق.

لا ينحصر اهتمام التقانة الحيوية بتأشيب الـ DNA والكلونة أو الاستنساخ الخلوي، فلقد استعملت التقانة الحيوية في إنتاج مواد بسيطة وعادية كحمض الستريك، والبيرة والخبز، والأغذية التي تعتمد على التخمر كالجبن، واللبن، ومضادات الحيوية. . . إلخ. كما اهتمت أيضاً بتقديم تكنولوجية نظيفة غير ملوِّثة كرصيد للألفية الثالثة، وبتوفير حلول سليمة لمعالجة النفايات والمشاكل البيئية. والخلاصة، إن التقانة الحيوية هي إحدى أهم تقانتين في القرن الحادي والعشرين(*)، التي ستساهم في نمو وتطوير مختلف أقطار العالم في العقود

(*) التقانة الثانية هي التقانة النانوية (Nanotechnology).

القليلة القادمة، حيث ستساهم في تطوير المستوى المعيشي والرعاية الصحية من خلال تأثيرها في نوعية الغذاء ومستوى إنتاجه في البيئة ككل. في الحقيقة لا يوجد أي جانب في حياتنا إلا وسيتأثر بالتقانة الحيوية.

سيوفر هذا الكتاب نظرة شمولية واسعة ودقيقة للعديد من أسس التقانة الحيوية، كما سيعرض بعض الأمثلة على كيفية وضع هذه الأسس حيز التطبيق، متتبعين الخطوات المتسلسلة انطلاقاً من المواد الأولية وحتى المنتج النهائي. تجدر الإشارة هنا إلى أنه نظراً إلى تعدد الاهتمامات والاختصاصات في مجال التقانة الحيوية كان من الصعب، في هذا الكتاب، الإلمام بكل الجوانب، ومن المستحيل عرض كل علميات الإنتاج، إذ يتطلب القيام بذلك العمل تحضير موسوعة علمية. عوضاً عن العمل الموسوعي، لقد حاولنا في هذا الكتاب تقديم وصف شامل ودقيق للأسس في التقانة الحيوية، آملين أن نعطي القارئ فهماً عميقاً وإيحاءً وتعليمات حول الفنون والمهارات في هذا الاختصاص.

بعد صدور الطبعة الأولى، مرّ بنا حدث أليم، فقدنا فيه زميلاً وصديقاً (John Bulock) جون بلوك، الذي خرجت الطبعة الأولى إلى النور بفضل جهوده وإصراره. عند وفاته في عام 1996 كان جون بلوك قد بدأ بالتخطيط للطبعة الثانية من هذا الكتاب، لذلك فإنه من دواعي سرورنا وفخرنا أن نكمل ما بدأ به، وأن نسير على خطاه لكي يتم نشر الطبعة الثانية. كان جون من المتحمسين والمشجعين للتقانة الحيوية، وسيبقى في ذاكرتنا كعالِم متميزٍ، وله نهدي هذا الكتاب.

مقدمة الطبعة الثالثة

جذب علم التقانة الحيوية الأنظار والاهتمام في مجالات شتى، من إنتاج مضادات الحيوية وغيرها من منتجات الرعاية الصحية، وصولاً إلى معالجة النفايات والتخلص منها. إن أفق اهتمامات التقانة الحيوية والأغوار التي تسبرها هذه التقنية في تطور وازدياد مستمر مع مر السنين، ففي كل عقد نلمس تقدماً هائلاً في المجالات التطبيقية. إن الفترة الزمنية بين الطبعة الأولى لهذا الكتاب والطبعة الثانية هي أربعة عشر عاماً، بينما الفرق بين الطبعة الثانية والطبعة الثالثة هي خمسة أعوام فقط. ويعود السبب في ذلك إلى الخطوات السريعة والتطورات المهمة في مجالات مختلفة كمجال علم الأحياء الجزيئية (Molecular biology) وعلم الوراثة، والتطبيقات لهذين المجالين في التقانة الحيوية، مع ما ترتب على ذلك من تقدم على صعيد علم الأحياء المجهرية وزراعة الخلايا النباتية والحيوانية على حدّ سواء، كل ذلك لخدمة حياتنا وجعلها أكثر رفاهية. إن التقانة الحيوية لازالت تعتبر المحرك المهم في العالم لإنتاج مختلف المواد من أجل حياة أفضل وبيئة سليمة. ومن المتوقع أن تبقى التقنية الحيوية خلال النصف الأول من القرن الحالي رائدة في المجال العلمي البحث والصناعي على حد سواء. لذلك يُتوقع أن تستمر التقانة الحيوية بتقديم الخدمات الصحية، الغذائية، والرفاهية للبشرية طالما وجدت المجتمعات المدنية المتحضرة.

اهتمت الطبعة الجديدة من هذا الكتاب بعرض التطورات الأساسية في مجال التقانة الحيوية، وفي نفس الوقت حرصت هذه الطبعة على ترسيخ المفاهيم والمبادئ الأساسية لهذا العلم وهندسته، ما يشكل ضرورة لفهم القواعد الأساسية. لقد تمّت إضافة فصول جديدة ومهمة في هذه الطبعة في مواضيع تتضمن أسس ومبادئ هذه التقانة، وكذلك في مجال التطبيقات المختلفة المرتكزة على هذه التقانة. كما تمّت أيضاً مراجعة الفصول الأخرى بشكل دقيق وعميق من أجل تحديثها لمواكبة التطورات الجديدة.

لا بد من الإشارة إلى أن كل المؤلفين المشاركين في هذا الكتاب هم من ذوي الخبرة، وقد قدموا مساهمات عالمية مهمة للتقانة الحيوية. إننا نثني على مشاركتهم والوقت الثمين الذي أعطوه لكتابة الفصول ومراجعتها وتصحيحها، رغم انشغالهم وضيق وقتهم. إن مهمتنا كمحررين كانت سهلة نسبياً، حيث اقتصر عملنا على القراءة ومطالبة المؤلف بتوضيح هنا أو اختصار بعض التفاصيل هناك. لا بد لنا أيضاً من أن نُذكّر بأهمية التشجيع من قبل الناشر وإصراره وجهوده في تحسين الإخراج الشكلي لهذه الطبعة، خاصة وأن الكتاب قد لاقى رواجاً عالمياً على مستوى مرموق. ومما لا شك فيه أن الناشر وقرّاء هذا الكتاب يستطيعون تمييز الكتاب الجيد من غيره.

بالرغم من ثقتنا بأن الطبعة الجديدة هذه تعكس أحدث التطورات الحاصلة في مجال التقانة الحيوية، فإننا بنفس الوقت نعلم استحالة الإلمام بكل الجوانب التفصيلية لهذه التقانة المتشعبة، خاصة أن الكتاب عبارة عن مجلد واحد. لكننا نعتقد بأن المواضيع المهمة والجوانب الأساسية قد تمّت تغطيتها بشكل دقيق.

المحتويـات

الجزء II
التطبيقات العملية

تقديـــم

سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية
مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي

يطيب لي أن أقدم لهذه السلسلة التي جرى انتقاؤها في مجالات تقنية ذات أولوية للقارئ العربي في عصر أصبحت فيه المعرفة محركاً أساسياً للنمو الاقتصادي والتقني، ويأتي نشر هذه السلسلة بالتعاون بين مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية والمنظمة العربية للترجمة، ويقع في إطار تلبية عدد من السياسات والتوصيات التي تعنى باللغة العربية والعلوم، ومنها:

أولاً: البيان الختامي لمؤتمر القمة العربي المنعقد في الرياض 1428هـ 2007م الذي يؤكد ضرورة الاهتمام باللغة العربية، وأن تكون هي لغة البحث العلمي والمعاملات حيث نصّ على ما يلي: (وجوب حضور اللغة العربية في جميع الميادين، بما في ذلك وسائل الاتصال، والإعلام، والإنترنت وغيرها).

ثانياً: «السياسة الوطنية للعلوم والتقنية» في المملكة العربية السعودية التي انبثق عنها اعتماد إحدى عشرة تقنية إستراتيجية هي: المياه، والبترول والغاز، والبتروكيميائيات، والتقنيات المتناهية الصغر (النانو)، والتقنية الحيوية، وتقنية المعلومات، والإلكترونيات والاتصالات والضوئيات، والفضاء والطيران، والطاقة، والمواد المتقدمة، والبيئة.

ثالثاً: مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي التي تفعِّل أيضاً ما جاء في البند أولاً عن حضور اللغة العربية في الإنترنت، حيث تهدف إلى إثراء المحتوى العربي عبر عدد من المشاريع التي تنفذها مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية بالتعاون مع جهات مختلفة داخل المملكة وخارجها. ومن هذه المشاريع ما يتعلق برقمنة المحتوى العربي القائم على شكلٍ ورقيٍّ، وإتاحته على شبكة الإنترنت، ومنها ما يتعلق بترجمة الكتب الهامة، وبخاصة العلمية،

مما يساعد على إثراء المحتوى العلمي بالترجمة من اللغات الأخرى إلى اللغة العربية بهدف تزويد القارئ العربي بعلم نافع مفيد.

تشتمل السلسلة على ثلاثة كتب في كلٍّ من التقنيات التي حددتها «السياسة الوطنية للعلوم والتقنية». واختيرت الكتب بحيث يكون الأول مرجعاً عالمياً معروفاً في تلك التقنية، ويكون الثاني كتاباً جامعياً، والثالث كتاباً عاماً موجهاً إلى عامّة المهتمين، وقد يغطّي ذلك كتاب واحد أو أكثر. وعليه، تشتمل سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدمة على ما مجموعه ثلاثة وثلاثون كتاباً مترجماً، كما خصص كتاب إضافي منفرد للمصطلحات العلمية والتقنية المعتمدة في هذه السلسلة كمعجم للمصطلح.

ولقد جرى انتقاء الكتب وفق معايير، منها أن يكون الكتاب من أمهات الكتب في تلك التقنية، ولمؤلفين يشهد لهم عالمياً، وأنه قد صدر بعد عام 2000، وأن لا يكون ضيِّق الاختصاص بحيث يخاطب فئة محدودة، وأن تكون النسخة التي يترجم عنها مكتوبة باللغة التي ألّف بها الكتاب وليست مترجمة عن لغة أخرى، وأخيراً أن يكون موضوع الكتاب ونهجه عملياً تطبيقياً يصبّ في جهود نقل التقنية والابتكار، ويساهم في عملية التنمية الاقتصادية من خلال زيادة المحتوى المعرفي العربي.

إن مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية سعيدة بصدور هذه المجموعة من الكتب، وأود أن أشكر المنظمة العربية للترجمة على الجهود التي بذلتها لتحقيق الجودة العالية في الترجمة والمراجعة والتحرير والإخراج، وعلى حسن انتقائها للمترجمين المتخصصين، وعلى سرعة الإنجاز، كما أشكر اللجنة العلمية للمجموعة التي أنيط بها الإشراف على إنجازها في المنظمة، وكذلك زملائي في مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية الذين يتابعون تنفيذ مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي.

الرياض 20/ 3/ 1431 هـ
رئيس مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية
د. محمد بن إبراهيم السويل

الجزء I

الأسس والمبادئ

Basis and Fundamentals

الفصل الأول

تفهم وتقبل الرأي العام للتقانة الحيوية

Public Perception of Biotechnology

جي. أي. سميث **J. E. Smith**

جامعة ستراثكلايد المملكة المتحدة **University of Strathclyde - UK**

1.1 المقدمة Introduction

إن تفهم الناس لهذه التقانة والوعي بها له وقع كبير على مسيرتها، وكذلك على توقيت وتوجيه تطوراتها، كما له الأثر أيضاً في قدرة الناس على التمييز، والقبول أو الرفض لمنتجات وخدمات التقانة الحيوية. يختلف هذا التفهم والوعي للتقانة الحيوية بين الأقطار والقارات، فسيختلف مثلاً بين أمريكا الشمالية و جنوب شرق آسيا... كما سيتغير وفقاً لعوامل أخرى متغيرة، نذكر منها:

- الرفاهية الاقتصادية والوفرة
- مستوى التعليم
- ثقافة المجتمع والقيم والمعتقدات الدينية والعادات التقاليد.
- المساهمات المجتمعية والمؤسساتية.

إن النظرة الحالية للتقانة الحيوية تثير الكثير من المناقشات والجدل، خاصة في بلدان الاتحاد الأوروبي. وقبل الدخول في تفاصيل وأمثلة على مستوى تفهم الناس للتقانة الحديثة، وخاصة تقنية الجينومية (Genomic) أو البروتينومية

(Proteomic)، لا بد من إلقاء الضوء على المراحل التاريخية لتطور التقانة الحيوية ودورها الإيجابي في مجال الصناعة والطب والزراعة والتجارة والبيئة. فلقد تم استعمال علم الأحياء المجهرية عبر عدة قرون بشكل حِـرَفي مبسط في صناعات مختلفة كالبيرة، والأجبان والألبان، وفي تخمير اللحم المسمى السلامي (Salami)... إلخ، من صناعات استخدمت فيها هذه الأحياء المجهرية كحرفة فنية أكثر مما هي علمية، حيث إن طرق الإنتاج كانت مفهومة بشكل جيد، ولكن طبيعة عمل هذه الأحياء وميكانيكية التفاعلات الكيميائية الحيوية (Biochemical) لم تكن معروفة. إن اكتشاف دور الأحياء المجهرية الإيجابي في تلك الصناعات وتشخيصها لم يحصل إلا في القرن السابع عشر والثامن عشر. تلت ذلك تطورات في علم الأحياء المجهرية والكيمياء الحياتية، ما ساعد في فهمٍ أفضل للطرق التجريبية التقليدية وضبط التفاعلات. أضف إلى كل الصناعات المعروفة سابقاً، صناعات حديثة كإنتاج مضادات حيوية واللقاحات وكثير من البروتينات العلاجية و غيرها الكثير الذي يصعب حصره. لا شك أن في كل من الأمثلة السابقة من الصناعات ما ساهم بشكل ملموس ومباشر على تحسين مستوى رفاهية المجتمع والشعب.

لماذا إذاً القلق من التقانة الحيوية في السنوات الأخيرة؟ مما لا شك فيه أن السبب الأساس يعود إلى التقدم السريع في مجال علم الأحياء الجزيئية (Molecular biology) وخاصة في تقنيات تأشيب الـــDNA (rDNA) أو ما يمكن تسميته بالتقانة الجينية، الذي بفضله تمكّن العلماء والدارسون من فهم أعمق، واستخدام طرق لضبط التفاعلات الحيوية والتحكم بها. فمن خلال التقانة الجينية يمكن أيضاً دمج جينات مأخوذة من كائنات مختلفة (نبات وجراثيم، إنسان وحيوان على سبيل المثال) وبالتالي التلاعب المباشر بالمعلومات الوراثية للخلية.

فالتقانة الحيوية تعطينا الفرصة على قطع الـــDNA المحتوي على مورث ذي صفة مثيرة لاهتمامنا، ونقله إلى كائن مجهري آخر أو إلى نبات أو حيوان، فنقل الجينات هذه يمكن أن يتم ضمن الفصيلة الواحدة أو عبر الفصائل.

يفترض بأن تؤدي التطورات الحديثة في مجال الجينومية والبروتيومية إلى تطبيقات عملية في مجالات شتى، وقد حصل بعضها فعلياً، وخاصة بما يتعلق بصحة الإنسان وتحسين معيشته، ونسوق من الأمثلة ما يلي:

- استخدام الكائنات المعدّلة وراثياً لإنتاج مواد بيولوجية-صيدلانية كمادة الأنسولين (Insulin) واللقاحات على سبيل المثال.
- فهم وتوضيح الأسس والأسباب لأمراض متعددة على المستوى الجزيئي.
- دراسة التسلسل الجيني الكلي (الجينومي) للعوامل الممرضة عند الإنسان مما يزيد من فرص علاج أفضل وأنجح.
- تطوير تقنية العلاج الجيني (Gene therapy) لأمراض وراثية وسرطانية.
- تطوير طرق وأساليب أسهل وأسرع لتشخيص الأمراض، باعتماد مبادئ تقنيات البيولوجيا الجزيئية والمناعية.
- تحسين النوعية الغذائية وذلك بتطبيق منتخب لتقنية التعديل الوراثي على النبات (Genetic modification).

الجدول 1.1: خصائص مهمة لمحاصيل زراعية خضعت للتعديل الوراثي
مقاومة الحشرات والآفات
مقاومة الأمراض الفيروسية والفطرية
تعديل في محتوى النبتة من الزيوت والنشاء والبروتين لتأمين مواد خام أولية مستمرة ومتجددة لإنتاج البلاستيك ومساحيق الغسيل والشحوم المخففة للاحتكاك (Lubricants) القابلة للتآكل والتفكك حيوياً (Biodegradable)، وكذلك لصناعة الورق ومواد التغليف، ولتحسين نوعية الخبز والخمور.
مقاومة مبيدات الأعشاب (Herbicide) أو أنواع محددة منها، والعمل على تحسين كفاءة المبيد لجهة منع نمو الأعشاب الضارة بالمحصول، وذلك باستعمال أقل كمية من المبيد.
التغيير الشكلي للنباتات وزهورها، كارتفاع النبتة، وتوقيت تفتح الزهور ولون البتلات.
التقليل من سقوط البذور وفقدانها أثناء عملية الحصاد.

تغيرات في نضج الثمار والدرنات وصلاحيتها بعد التخزين. إذ يُتوقع أن يصبح تخزين البطاطس المعدلة وراثياً أسهل، بحيث يقل اعتمادها على مضادات التبرعم التي كانت من ضروريات التخزين.

زيادة قابلية النباتات على مقاومة ضغوط العوامل البيئية وتغيراتها كالحرارة، والبرودة، وكمية الماء وملوحة التربة.

زيادة قدرة بعض النباتات على إزالة المعادن السامة من التربة، في محيط المناجم مثلاً، ما يمكن تسميته بالمداواة الحيوية (Bioremediation).

إزالة المواد المسببة للحساسية من بعض المنتجات الزراعية، كالأرُزّ.

زيادة نسبة الفيتامينات والمعادن النافعة والمواد المضادة للسرطان.

إنتاج مواد صيدلانية كمضادات التخثر، وكذلك اللقاحات المأكولة، أي التلقيح عن طريق أكل النبات.

المصدر:

P. J. Dale, "The GM Debates: Science or Scaremongering," *Biologist*, vol. 47 (2000), pp. 7-10.

تطوير وسائل وأدوات تحسس حيوية (Biosensors) كمجس الـــDNA المعروف باسم (DNA probes) وذلك لمراقبة وقياس عمليات الأيض ونواتجها (Metabolites) داخل الجسم.

إن التقانة الجينية عند النبات (التعديل الوراثي) تقتضي إدخال تغيير صغير الحجم في الـــDNA بزرع مورث جديد، من أجل إضافة صفات أو مميزات جديدة محسنة للنبتة، ومن تلك الميزات نذكر على سبيل المثال مقاومة النبتة للأمراض الحشرية والفطرية أو مقاومة الجفاف، أو إنتاج بروتين أو أي مركب آخر ذي أهمية (انظر الأمثلة على ذلك في الجدول 1.1). كما يمكن من خلال تقانة التعديل الوراثي إزالة صفة غير مرغوب بها عبر قطع أو تثبيط المورث المسؤول عن تلك الصفة، نسوق مثال على ذلك تعطيل الأنزيم الذي يسبب ليونة ثمرة الطماطم عند احمرارها، إذ إن تلك الليونة التي ترافق النضج تؤدي إلى الفساد السريع للمحصول. وعليه، عند تثبيط هذا المورث تبقى الطماطم الناضجة بحالة جيدة وصلبة ومستقرة ولعدة أسابيع.

تسمى كل هذه النباتات كائنات معدّلة وراثياً (Geneticaly modified) ويتم اختصارها بـــ GM. إن تقانة التعديل الوراثي تعتمد تطبيق مبادئ علم الأحياء الجزيئي، وبالتالي فإنها تختلف كلياً عن عملية تربية وتأصيل النبات التقليدية (Plant breeding) التي تستعمل التهجين ضمن الفصيلة النباتية الواحدة (Selective interbreeding) بهدف انتقاء سلالة ذات الصفات المرغوب فيها في النبات. بينما في تقانة الـــ GM يتم نقل مورث الصفة المحسِّنة داخل المختبر، وبشكل أسرع من التهجين بمئات المرات ونتائجه أضمن وأدق. لمعلومات تفصيلية عن الـــ GM راجع التقرير على العنوان الأنترنت التالي:

<http://www.apec.umn.edu/faculty/frunge/globalbiotech04.pdf>.

إذاً، لا بد للزراعة من استعمال كل التقنيات، ومنها التعديل الوراثي أي الـــ GM ، وذلك بهدف تحسين مستوى التغذية للبشر والحيوان، وتأمين الكمية اللازمة من الغذاء لسكان العالم المتزايد عددهم في وقت تتناقص فيه مساحة الأراضي الزراعية. يشهد العالم الآن تقبلاً سريعاً لتقانة التعديل الوراثي، وخاصة في أمريكا وآسيا، ولكنها لا تزال تواجه معارضة منُظَّمة في أوروبا. ومما أثار المخاوف في بعض أنحاء العالم إطلاق كائنات مجهرية معدلة وراثياً، في نُظُم بيئية مختلفة، وذلك في إطار استخدام تلك الكائنات كمبيدات حيوية للآفات وتطبيق المعالجة الحيوية لمشاكل بيئية.

لقد شاع في هذه الأيام استعمال مجسّات الـــ DNA (DNA Probes) لتشخيص هوية الأحياء المجهرية في نُظُم بيئية معقدة، وكذلك شاع استخدام الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً (GM microorganisms) كأدوات لضبط مستويات التلوث البيئي ببعض المركبات. بالإجمال، لقد تم قبول معظم الإبداعات الناتجة من التقانة الحيوية الحديثة، إلا أن مجالات ثلاثة لا زالت تثير القلق. أولاً هناك الخطر الصحي المحتمل، أو المتخيَّل الموهوم، للكائنات المعدلة وراثياً المنتجة للمواد الصيدلانية عن طريق هذه التقانة، وثانياً التطورات المتعلقة بالوراثة الجزيئية (Molecular Genetics) وبالأخص المتعلقة بعملية التناسل والتكاثر

البشري، وأخيراً هناك الجانب الأخلاقي المتعلق بجمع المعلومات الجينية (الخاصة بالفرد) ومدى الحرص على التكتم عليها.

2.1 وعي العموم بموضوع الهندسة الوراثية

Public awareness of genetic engineering

إن نظرة الرأي العام وتفهُّمه وتقبُّله لهذا الاختصاص هو أمر بالغ الأهمية، إضافة إلى أنه معقد. فخلال السنوات القليلة الماضية جاهد المخططون لسياسة التقانة الحيوية للوصول إلى توازن بين مصالح المؤسسات الحكومية والصناعية والأكاديمية من جهة والهيئات المناصرة للبيئية من جهة أخرى، وذلك في أجواء يسودها التوتر وتضارب الأولويات وبرامج العمل. إذ إن موضوع التقانة الجينية يطرح سؤالاً جوهرياً يتمحور حول تعلق النُظُم والتشريعات المفروضة بتطبيق تقانة الـــDNA المؤشب بذاتها بهدف الإنتاج، أو بالمنتج الذي نحصل عليه من خلال استعمال تلك التقانة. إنه السجال الدائر منذ سنوات حول "المنتج مقابل العملية الإنتاجية"، فالآراء متضاربة حول ما إذا كان المنتَج أو عملية الإنتاج هو ما يحدد السياسات العامة والنُظُم المتعلقة بالتقانة الحيوية. كما يتضمن الجدل ما إذا كانت القرارت بشأن نُظُم التقانة الحيوية تُتَّخذ من قبل العلماء والتقنيين، أم يجب إشراك الرأي العام في آلية صنع القرار. فمن الواضح حالياً أن جوانب مختلفة من التقانة الحيوية الحديثة تبقى قيد النقاش والمداولة. وقبل التوصل إلى سياسات مهمة ونصائح وأحكام أخلاقية لا بد من الأخذ بأسباب محددة، وبالانتقادات والدلائل والبراهين والتحاليل الدقيقة من قبل ذوي الكفاءة. إن وضع أسس السياسة الإجتماعية من اختصاص السياسيين والرأي العام، وكذلك الأمر في شأن السياسة العلمية، على الأقل في المجتمع الديمقراطي، فالأمر يعود إلى الشعب، حتى وإن كانت أقلية منهم تفهم الجانب العلمي التفصيلي.

باختصار، من الواضح أن التقانة الحيوية قد أثارت اختلافاً في وجهات النظر، لم يظهر بشأن أي من التقنيات الأخرى السابقة. ويزداد التعقيد في المجتمعات متعددة الثقافات، والأديان والتيارات السياسية المختلفة، حيث لا بد من

التوفيق بين مختلف وجهات النظر بطريقة ديمقراطية. وهنا لا بد من التنويه بأهمية وضرورة توعية وتثقيف الرأي العام بشأن التقانة الحيوية. إلى ذلك يجب القول إن الكثير من الناس يعيشون حالة خوف وقلق متزايد من موضوع التقانة الحيوية بشكل عام على حياة الناس، وفي بعض الأحيان يشعرون بعدم ثقة تجاه العلماء، وإن كان هذا الشعور غير مبرر.

لقد قامت محاولات كثيرة وجهود مهمة خلال العقود الأخيرة لقياس ورصد مستوى التوعية عند الرأي العام عن طريق الاستفتاءات والمؤتمرات، وباستعمال ما يسمى البارومتر الأوروبي (Eurobarometer). يبين الجدول (2.1) نتائج بعض الاستطلاعات الأوروبية حول وجهة نظر الرأي العام في تطبيقات التقانة الحيوية والسيناريوهات المختلفة. ويُطرح هنا السؤال حول كيفية العمل لرفع درجة الوعي لدى الرأي العام بما يتعلق بالتقانة الوراثية ضمن إطار التقانة الحيوية، كما يُطرح السؤال حول مستوى المعرفة التي يجب أن يحصل عليها الرأي العام والطريقة لذلك، فمن خلال الإجابة نضمن بأن لا تعاني التقانة الحيوية، التي لا شك من فوائدها، كما عانت تقنية معالجة الأغذية بالإشعاع او التشعيع (Food irradiation) في مطلع تسعينيات القرن الماضي، في المملكة المتحدة. ففي ذلك الوقت، وبالرغم من إثبات سلامة وفعالية استعمال التشعيع في تعقيم المواد الغذائية وقتل الأحياء المجهرية والبكتيريا الممرضة، فقد رفض الرأي العام تلك التقنية بسبب الكارثة النووية التي حصلت في تشرنوبيل (Chernobyl)، وذلك بسبب الخلط في ذهن العامة بين عملية التشعيع (Irradiation) والمواد ذات النشاط الاشعاعي (Radioactivite). إذاً، من أجل تواصل فعّال وتوعية الرأي العام حول مخاطر وفوائد الهندسة الوراثية، لا بد من تفهم مخاوف الناس، كما لا بد من التنبه لتفادي المخاطر التقنية.

الجدول 2.1 : مواقف الرأي العام من تطبيقات الهندسة الوراثية

	مرتاح (%)	دون موقف (%)	غير مرتاح (%)
إنتاج بلاستيك حيوي بواسطة كائنات مجهرية	91	6	3
دمج خلايا لتحسين نوعية المحاصيل	81	10	10
علاج أمراض كالسرطان	71	17	9.5
جعل الطماطم أقل عرضة للتلف بعد القطف	71	11	19
تنظيف بقع النفط المتسرب	65	20	13
معالجة سمية مخلفات المصانع	65	20	13
استعمال أنزيمات مضادة لتخثر الدم تم إنتاجها عند الجرذ	65	14	22
البحوث الطبية	59	23	15
تصنيع الأدوية	57	26	13
تطوير محاصيل لتنمو في دول العالم الثالث	54	25	19
تطوير أبقار معدلة وراثياً مقاومة لالتهاب الثدي	52	16	31
إنتاج محاصيل زراعية مقاومة للأمراض	46	29	23
إنتاج أنزيم تجبين الحليب (كيموزين) بواسطة كائنات مجهرية	43	30	27
تحسين كمية المحاصيل	39	31	29
استعمال فيروسات للقضاء على حشرات آفات المحاصيل	23	26	49
تحسين كمية إنتاج الحليب	22	30	47
استنساخ سلالات الأبقار الممتازة	7.2	18	72
تغيير الشكل الخارجي للبشر	4.5	9.5	84
إنتاج حيوانات هجينة	4.5	12	82
إنتاج أسلحة بيولوجية	1.5	2.7	95

لقد أظهر الباروميتر الأوروبي طيفاً واسعاً من آراء ووجهات نظر اختلفت بحسب الجنسية والمعتقد الديني والمعرفة بالموضوع وبتطبيقاته (انظر الإطار 1.1). كما تبين أن أهم العوامل المساهمة في اختلاف المواقف من التقانة الحيوية هو المعتقد الديني المتنوِّع، سواء عُبِّر عنه بصراحة أو بأسلوب مبطَّن، وذلك لأن المفاهيم الأخلاقية والدينية تمس الطبيعة وعلاقتنا بها. هل ننظر إلى الطبيعة على أننا جزء منها معتمدين على نباتاتها وحيواناتها، وهي منظومة متكاملة ولها وسائل إنتاج طبيعية، وعليه يجب أن لا نحاول التأثير فيها بوسائل "غير طبيعية"؟ أم أننا نرى الطبيعة كمجرد مصدر للمواد الخام الموجودة لمنفعة الجنس البشري؟ لا بد من القول بأن الإنسان يتلاعب بشكل غير مباشر بمورثات النباتات والحيوانات منذ قرون خلت، وذلك من خلال التزاوج المنتخب وانتقاء صفات معينة، أو التخفيف من ضرر بعض الصفات الأخرى. وبالتالي فلقد أصبحت النباتات والحيوانات في يومنا هذا قليلة التشابه مع أسلافها القديمة. لقد كانت تلك التغيرات تتم وفقاً لاحتياجات الناس والمستهلكين ومتطلباتهم، وقد لاقت قبولاً منهم خاصة أنه قد ساهم بخفض أسعار الغذاء. وفي الحقيقة، إن أغلى سعر دفع لمحصول الحنطة كان في القرن الثالث عشر وأرخصه كان في عام 2005. ففي الطرق التقليدية للتهجين والانتقاء، هناك تغيير يحصل في المورثات على مستوى كل خلايا الكائن الحي، ويتم انتقاء السلالة ذات الصفة المحسنة والمطلوبة بناء على الصفات الشكلية الخارجية (Phenotype)، وغالباً ما يتم ذلك من دون الإحاطة بكل التغيرات الجينية على المستوى الجزيئي، إذ ربما تحصل مع التغيرات الجينية المرغوبة تغيرات أخرى غير محبذة. بينما باستعمال الوسائل الجديدة في التقانة الحيوية، ستكون عملية التغير على مستوى المورثات فائقة الدقة، إذ يتم التعاطي على المستوى الخلوي الجزيئي بحيث تكون النتيجة أفضل، ومتوقعة مسبقاً، كل هذه المحاسن تقرن مع المحافظة على الهدف الأساس لوسائل التهجين التقليدية. فبذلك يمكن إدخال عدد كبير من التغيرات على فصيلة معينة لإعطاء نتائج أفضل وأسرع بكثير من الطريقة التقليدية.

الإطار 1.1 :البارومیتر الأوروبي لعام (1997) حول فهم ووعي الرأي العام للتقانة الحیویة.

تَعتبر الأكثریة من الأوروبیین أن تطبیقات التقانة الحیویة مفیدة للمجتمع، وأن تطویر طرق التشخیص وكذلك إنتاج المواد الطبیة هي الأكثر أهمیة والأقل ضرراً.

استخدام التقانة الحدیثة في إنتاج الغذاء، وكذلك إدخال مورثات الإنسان في الحیوانات بهدف الحصول على أعضاء للزرع عند الإنسان، یُعد ذلك خطراً وغیر مفید وغیر مقبول.

یرى الأوروبیون أن هذه التقانة من غیر المتوقع أن تؤدي إلى معالجة مشكلة المجاعة في البلدان النامیة.

تعتقد الأكثریة المطلقة بضرورة التأشیر الواضح على غلاف المنتج الذي یحتوي على مواد معدلة وراثیاً.

تمیل الأكثریة من الأوروبیین إلى أفضلیة استمرار التهجین بالطرق التقلیدیة بدلاً من تغیر الصفات الوراثیة للنبات أو الحیوان من خلال التقانة الحیویة.

أقل من ربع الأوروبیین یرى بأن النُظُم والتشریعات الحالیة كافیه لحمایة الناس من الخطر المترتب على التقانة الحیویة.

فقط عشرون بالمئة من الأوروبیین یعتقدون بأنه یمكن ترك عملیة وضع نُظُم وتشریعات التقانة الحیویة لقطاع الصناعة.

ثلث الأوروبیین یعتقدون أنه من الأجدر أن تتولى المنُظمات العالمیة كالأمم المتحدة ومنُظمة الصحة العالمیة المسؤولیة الأولى عن سن النُظُم والتشریعات لضبط التقانة الحیویة، وبالدرجة الثانیة تأتي مسؤولیة الهیئات العلمیة.

من هنا، لا بد من مقیاس سلیم لتجاوب الرأي العام اتجاه الموضوع، إذ إن الرأي العام لیس متجانساً ولا ذا مفهوم واحد، ولا كیاناً واحداً، بل مزیجاً من الاهتمامات، والمصالح، والمواقف، والقیم والمستوى الثقافي. ففي عام 2003 قامت الحكومة في المملكة المتحدة باستطلاع للرأي شمل خمسة وثلاثین ألف شخص

أبدت غالبيتهم معارضتها للمحاصيل المعدلة وراثياً، وأعربت عن عدم ثقتها بالقطاع الزراعي – الصناعي المعتمد على التقانة الحيوية (Agri-biotech industry). كما أبدت الغالبية عدم ثقتها بقدرة الحكومات على وضبط وتنظيم هكذا منتجات. لقد تم ذلك الاستطلاع ضمن إطار مناظرة عامة وطنية حول الكائنات المعدلة وراثياً (GM-National Public Debate) الذي تم تصميمه كدراسة تجريبية شاملة للاستدلال على موقف الرأي العام حيال الغذاء والمحاصيل المعدلة وراثياً، ولمعرفة مستوى الوعي والتفهم لموضوع النقاش حول التسويق المرتبط بالزراعة والتقانة الحيوية. لقد قدم ذلك الاستطلاع نتائج مثيرة للاهتمام، كما فسح المجال للتعمق في تساؤلات أكثر حول هذا الموضوع وتناقضاته. وفي المقابل، فلقد أصدرت الهيئة المؤيدة للتقانة الحيوية الزراعية والصناعية في لندن طعناً في هذا التقرير، زاعمةً بأن الشريحة التي تم استفتاؤها لا تمثل الرأي العام، وأن معظم الإجابات كانت متأثرة ومسيرة من قبل هيئات معارضة لتقانة التعديل الوراثي. وقد اعتبرت تلك الهيئة أن الجانب المقلق في نظرة الرأي العام للتقانة الحيوية هو سذاجة وبساطه وتدني مستوى الفهم لدى العامة للأسس الوراثية الجينية للحياة، واعتبرت أيضاً أن منُظمات مختلفة قامت بإثارة القلق والخوف في نفوس العامة من الكائنات المعدلة وراثياً، وذلك من دون تقديم أية معلومات علمية تدعم إدعاءاتهم. لقد قام ناشطون في جمعية أصدقاء الأرض (Friends of earth) بإتلاف حقل من محاصيل كانت مصممة كتجربة علمية للبحث بشأن سلامة النباتات المعدلة وراثياً. فيُعتبر هؤلاء الناشطون، كما المقالات الصحافية المستفزة والتي يكتبها صحفيون غير علميين، مسؤولين عن حالة القلق غير المبرر من تقانة التعديل الوراثي. أما الوضع في الولايات الأمريكية المتحدة فهو مختلف إذ إن تقُّبل الناس لهذه التقانة في ازدياد من دون عقبات تذكر، وبالتالي هناك ازدياد في مساحة الحقول المزروعة بالنباتات المعدلة وراثياً. بالإجمال، من الواضح أن تقبل وتفهم أهمية تقانة التعديل الوراثي يشهد تقدماً سريعاً في كافة أنحاء العالم.

الجدول 3.1: أسئلة تؤخذ بعين الاعتبار عند تقييم سلامة المحاصيل المعدلة وراثياً
• ما هي وظيفة المورث في الكائن الحي الذي أُخِذ منه ؟ • ما هو تأثير إدخال المورث الجديد في النبات الخاضع للتعديل الوراثي؟ • هل هناك أدلة على أيّ تغير في سميته أو إثارته للحساسية؟ • هل سيكون هناك تأثير جانبي في كائنات أخرى في البيئة؟ • هل هناك تغير في طبيعة وقابلية النبات المعدل على التأقلم في محيطه البيئي، كأن يتحول إلى عشب ضار يجتاح الوسط؟ • هل يمكن للجين المنقول أن ينتقل إلى نباتات أخرى، مثلاً عن طريق الطلع (Pollination) أو كائنات أخرى، وما هي تبعات ذلك؟

المصدر: P. J. Dale, "The GM Debates: Science or Scaremongering," *Biologist*, vol. 47 (2000), pp. 7-10.

3.1 النُظُم والتشريعات المطلوبة Regulatory requirements

1.3.1 سلامة الغذاء المعدل وراثياً

Safety of genetically engineered foods

تثار حالياً نقاشات واسعة في مختلف أنحاء العالم حول سلامة المحاصيل المعدلة وراثياً والمواد المشتقة منها، خاصة تلك المُعّدة للاستهلاك البشري. من أهم الأسئلة المطروحة في هذا المجال ما تم تدوينه في الجدول (3.1).

إن منُظّمة التعاون الاقتصادي والتنمية في باريس (OECD) قد أدخلت ضمن تعريفها لمفهوم السلامة الغذائية الجملة التالية: "لا بد من التأكد بشكل مقبول من عدم التسبب بأي ضرر من جراء استخدام المنتَج للهدف المقصود، وفي ظروف الاستهلاك المحددة مسبقاً. بالنسبة إلى المنظمة للمنظمة، عندما يكون الغذاء أو أحد مكوناته مشتقاً من محصول معدل وراثياً، يجب أن يُعتبر سليماً، أو حتى أسلم من الغذاء المنتج

بالطريقة التقليدية. إن مبدأ "التساوي الحقيقي" (Substantial equivalence) هو مفهوم مُطبَّق علمياً خلال دراسة السلامة الغذائية للكائنات المعدلة وراثياً مقارنة بالأغذية التقليدية، ويرافق ذلك أيضاً استعمال المنتج والتعرض له ضمن إطار الهدف المُراد من المنتَج. يُعتبر مبدأ "التساوي الحقيقي" مدخلاً ومقدمة لعمل قام على أسس الـــ Codex Alimentarius Commission.

للمزيد أنظر الموقع الالكتروني التالي، الذي يحتوي على نُظُم وضوابط ومعايير وأخلاقيات حول كل ما يتعلق بالمنتجات الغذائية:

<http://www.codexalimentarius.net/web/index-en.jsp>

أو: <http://www.who.int/entity/foodsafety/codex/an>.

لقد أصبح هذا الموقع الإلكتروني يُعتمَد بشكل أساسي من قِبل المستهلكين والمنتجين والعاملين والمصنعين للأغذية، وكذلك من قِبل هيئات الرقابة الغذائية والتجارة الدولية. إن المعلومات المستعملة للمقارنة وتطبيق "التساوي الحقيقي" يتم الحصول عليها من خلال وسائل تشخيص جزيئية وبروتينية، ويقتضي ذلك إجراء فحوصات، منها:

- نمط التعبير الجيني (Gene expression patterns).
- الصورة العامة عن البروتينات في الخلية (Protein profiling).
- التغييرات في تصنيع البروتينات (Changes in protein expression).
- اختلاف القدرات الأيضية (Difference in metabolite capabilities) .

إن إلزامية القيام بتلك التحاليل المتطورة والدقيقة يجعل من الصعوبة بمكان تطبيق النُظُم والمعايير العالمية لسلامة الغذاء في الكثير من البلدان النامية. مع ذلك، لا بد عند ظهور أي منتج معين إلى الأسواق من التأكد من النوعية والمطابقة لمستوى السلامة. لذلك لا بد من توجيهات وإرشادات في مجال علم السموم والغذاء في مرحلة يتطور فيها الغذاء ومحتوياته، وذلك كي يتم إلقاء الضوء على كل ما قد يشكل خطراً ومعالجته بأنسب الطرق. ولا بد من مقاربة هذا الموضوع، بناء على

المعطيات العلمية المتفق عليها، ولا بد أن تكون تحاليل السلامة ذات نتائج ثابتة ومتكررة ومقبولة من قبل السلطات الصحية، ولا بد لخلاصة التحاليل أن تكون مُقنعة تُرضي المستهلك.

لقد تم في أوروبا وضع النُظُم والقوانين ضمن إطار عمل شامل ومتكامل، ما يُؤمِّن حماية صحة الإنسان والبيئة من المخاطر الجانبية الناتجة من انتشار الكائنات المعدلة وراثياً (GMOs). هنا لا بد من ذكر توجيهين (قاعدتين) رئيسيين:

1. احتواء واستعمال الكائنات المعدلة وراثياً ضمن مساحات محددة ومعزولة.
2. نشر الكائنات المعدلة وراثياً بشكل بطيء ومبرمج ومسيطر عليه.

الاحتواء والاستعمال المحدد ينُظَّم في الاتحاد الأوروبي تحت صلاحية البند الخاص بالصحة والسلامة في العمل (Health and Safety at Work Act)، الذي تشرف عليه الهيئة التنفيذية للصحة والسلامة في المملكة المتحدة (Health and Safety Executive – HSE)، وتستلم الأخيرة المشورة والنصيحة من اللجنة الاستشارية حول التعديل الوراثي. هذه الضوابط تُطبَّق مباشرة ضمن المرسوم الأوروبي 90/219/EEC وتغطي التفاصيل الخاصة بالاحتواء للكائنات المعدلة وراثياً، بما فيها التي تستخدم لإنتاج المضافات الغذائية (Food additives)، والمواد المساعدة في التصنيع (Processing aids) (أي أنها لا تؤكل بشكل مباشر). كما تُلزِم أي مشروع تعديل وراثي بالقيام بكل الخطوات التفصيلية ليتم تقييم الخطر (Risk assessments)، مع تركيز خاص على دراسة التأثير في الكائن نفسه الذي تمتّ عملية التعديل الوراثي عليه.

يتم تنظيم إنتاج ونشر الكائنات المعدلة وراثياً في المملكة المتحدة تحت إشراف البند (Deliberate release regulations) ضمن قرار حماية البيئة (Environmental Protection Act) وتطبيق المرسوم الأوروبي (EC Directive 90/220/EC. وتشمل هذه النُظُم عملية إطلاق الكائنات المعدلة وراثياً في البيئة بهدف القيام بتجارب حقلية (Field trials) وكذلك بهدف التسويق. من

الأمثلة على ذلك زراعة المحاصيل المعدلة وراثياً للاستهلاك المباشر والتسويق، وكذلك زراعة الصويا المعدلة وراثياً للتصنيع الغذائي.

لا بد لكل محاولة إطلاق ونشر لكائن معدل وراثياً من الحصول على الموافقة من قبل الحكومة، وعلى الجهة المقدمة للطلب تقديم كل التفاصيل عن دراسة المخاطر على الصحة أو البيئة. ثم يتم فحص معطيات اختبار السلامة ونتائجه بدقة بالغة من قبل لجنة استشارية (Advisory Committee on Releases into the Environment) المكونة من اخصائيين مستقلين يقومون بتقديم التقرير للوزارة المعنية مباشرة.

لقد دخلت قوانين وضوابط جديدة حيز التنفيذ وذلك في أيار/مايو 1997 (EC Novel Food Regulations 258/97) التي تعتبر ملزمة في كل بلدان الاتحاد الأوروبي، وتقتضي الحصول على تصريح وموافقة قبل مرحلة تسويق أي غذاء جديد. هذا ويعتبر الغذاء جديداً إذا لم يتم استهلاكه سابقاً على مستوى واسع في الاتحاد الأوروبي. وتشمل تلك الضوابط، كما في البند 90/220/EEC، الأغذية المستحدثة المعدلة وراثياً أو التي تحتوي مواد معدلة وراثياً، أو التي أُنتجت بواسطة مواد معدلة وراثياً، ولكنها لا تشمل الأغذية التي تحتوي على الكائنات المعدلة وراثياً نفسها في المنتج النهائي المصنَّع.

ففي المملكة المتحدة يتم تقييم مستوى سلامة المواد الغذائية المستحدثة، ومن ضمنها الأغذية المعدلة وراثياً، من قبل لجنة أو هيئة استشارية مستقلة تسمى (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) ACNFP التي بدورها تقدم المشورة أيضاً إلى وكالة تقييس الأغذية (Food Standard Agency) انظر صفحة الأنترنت www.foodstandards.gov.uk التي اعتَمدت بشكل كبير على طريقة منظمة الصحة العالمية WHO والـــ OECD في قياس سلامة الأغذية المستحدثة. لقد حرصت الـــ ACNFP على الانفتاح والشفافية والعلنية في كل تصرفاتها وبرنامجها وتقاريرها السنوية والصحفية والإخبارية والمواقع الإلكترونية، وذلك بهدف تبديد المخاوف وسوء الفهم عند

الرأي العام، فهي تتخذ قراراتها بدوافع السلامة العامة فقط، وليس نتيجة أية ضغوط من ذوي النفوذ في القطاع الصناعي.

وفي كل ما سبق ذكره من تقييم للمخاطر الناتجة من الكائنات المعدلة وراثياً وغيرها، فقد قام بمهمة التقييم خبراء، وتم اتخاذ القرار بناء على الحرص على سلامة المستهلك. وبالرغم من كل هذا يبقى التقييم من قبل المختصين ذا طابع تقني ضيق، في حين أن نظرة الرأي العام والمستهلك (الذي غالباً ما يفتقد المعلومات الكافية) للمخاطر تكون أكثر تعقيداً وأوسع مجالاً، وتعتمد على مفاهيم مختلفة كالغرابة وعدم التآلف واحتمال حصول الكوارث وعدم القدرة على السيطرة على المنتج. إضافة إلى ما سبق، فإن الرأي العام يميل إلى المغالاة بشأن مخاطر التقنيات الحديثة كالهندسة الوراثية ويستخِفُّ أو يتناسى مخاطر نمط الحياة اليومية كركوب السيارة وشرب الكحول والتدخين أو أكل الأغذية الدسمة... إلخ. وللتوصل إلى الاعتدال في إدراك المخاطر المتعلقة بالهندسة الوراثية، لا بد من الموازنة بين الفوائد الكبيرة لتلك التقانة، بالأخص تلك الصحية والبيئية، وما يمكن أن يتمخض عنها من مشاكل.

أما عن التساؤل بشأن كيفية التواصل مع الرأي العام بهدف إظهار فوائد ومخاطر الهندسة الوراثية، فلا بد من اعتماد مصدر معلومات موثوق عند الرأي العام، يتميز بإحساسه بالمسؤولية والدقة والحرص على الصحة العامة. وتنشأ حالة انعدام الثقة والمغالاة عند الرأي العام نتيجة لاستعمال معلومات أو وقائع مشكوك بصحتها، أو غير دقيقة أو أسيء استعمالها.

2.3.1 وضع المعلومات على غلاف المنتج: ما هو المطلوب؟

Labelling: how far should it go?

لعل من أكثر الأمور المتعلقة بالهندسة الوراثية دقة وحساسية موضوع الإشارة على غلاف المنتج إلى تفاصيل المحتوى، وإلى أي مدى يجب التفصيل في ذلك. وتهدف معلومات الغلاف (labeling) إلى إعطاء الشخص فكرة وافية ومفصلة عن المنتج لكي يختار المنتج الذي يحتاجه، ويُقرر استهلاك المنتج أو الامتناع، كما تفيده معلومات الغلاف عن طريقة التخزين والتحضير لضمان سلامة

أفضل. لا بد هنا من التذكير أن المعلومات على غلاف المنتَج تكون مفيدة إذا كانت مفهومة من قبل المستهلك، ولا تعتمد مصطلحات علمية صعبة الفهم.

إن الهيئة الأمريكية للغذاء والدواء (US Food and Drug Administration) المعروفة بـــ FDA لا تشترط في المعلومات على غلاف المنتج أن تُبين الطريقة العملية للحصول على المنتج، وذلك لأنه يُفتَرض بأن تخضع الطريقة أو العملية الزراعية المُتبَعة إلى النُظم السارية، وتحصل على الموافقة من الهيئة المختصة، لذلك تنتفي الحاجة إلى كتابة عملية الإنتاج على الغلاف، علماً بأن هذا المبدأ مُتَّبَع مع غالبيه المنتجات الغذائية الأخرى. ولكن من جهة أخرى يمكن أن يثار الجدل حول رفض بعض الناس لعملية الإنتاج نفسها باستعمال تقانة محددة (كالهندسة الوراثية)، وعليه فإن من حقهم معرفة التقنية المتبعة للحصول على منتج معين من خلال المعلومات على الغلاف.

على الأقل ضمن بلدان الاتحاد الأوروبي، هناك دلائل كثيرة على الدعم القوي لفكرة كتابة معلومات واضحة على غلاف الأغذية المصنَّعة بالهندسة الوراثية. في ذلك جدال، إذ بالنسبة إلى البعض فإن المعلومات الملصقة على المنتج تساعد المستهلك للاختيار ولا علاقة لها بالصحة والسلامة. حيث إن مشكلة السلامة، إن وجدت، لن تساهم المعلومات المكتوبة على الغلاف بحل هذا الإشكال، فنلاحظ مثلاً أن علب السجائر تحمل إشارة تؤكد أن المنتج مضرّ بالصحة، وبالرغم من ذلك فإن الناس لا زالوا يشترونها. لقد تم إدخال ضوابط ونظم حديثة في الاتحاد الأوروبي تتولى خاصة تبيان المطلوب بشأن كتابة المعلومات على غلاف الأغذية المُنتَجة بالهندسة الوراثية، بالإضافة إلى المعلومات الأخرى المطلوبة لباقي الأغذية بشكل عام. ومما ورد في تلك النظم أن المكتوب على الغلاف يجب أن يبين أية معلومة عن المنتج قد تكون موضوعاً لجدل أخلاقي، كاحتوائها على نسخ من جينات حيوانية أو بشرية، أو أن المنتج الغذائي يحوي على كائنات حية معدلة وراثية. ولكن الاتحاد الأوروبي أكد إلزامية الإشارة على الغلاف عند احتواء المنتج لمواد معدلة وراثياً. إن العاملين في مجال التهجين لتحسين الإنتاج النباتي والحيواني يتحولون إلى استعمال الهندسة

الوراثية، وذلك بهدف الإنتاج الغذائي بأقل تكلفة، وهذا ما يطلبه المستهلك. مما جاء في النظم: "إذا كان المستهلك يصرّ على امتلاك الخيار بشأن شراء منتج معدل وراثياً أو الامتناع، فلا بد إذاً من الحرص على توفير كمية كافية من المنتجات غير المعدّلة، التي تتناقص تدريجياً.

لقد منع الاتحاد الأوروبي خلال أكثر من خمس سنوات الأغذية المعدلة وراثياً على اعتبارها خطرة على الصحة، علمًا أن الأسس التي بني عليها المنع لم تكن دقيقة. ثم تم تعديل هذه القوانين بالسماح شريطة أن توضع على الغلاف معلومات واضحة عن نوع وكمية المنتج المعدل وراثياً. وهذا النظام الجديد ينطبق على كل أنواع الأغذية بما فيها علف الحيوانات في المزارع والحيوانات الأليفة المنزلية، حتى وإن كانت كمية المادة المعدلة وراثياً قليلة جداً.

بما أن حوالى سبعين بالمئة من الأغذية المصنعة تحتوي على مالا يقل عن ثلاثين مادة أولية مستخلصه من الذرة والصويا (اللتين تعتبران حالياً أكثر منتَجَين معدلين وراثياً في الولايات المتحدة الأمريكية)، فلا بد من كتابة ذلك على غلاف تلك المنتجات. وإذا لم يشأ المصنِّع أو المسوِّق القيام بذلك فيتوجب عليه الاستعاضة عن تلك المواد بأخرى غير معدلة، مع تحمُّل كل الصعوبات والنفقات الباهظة المترتبة على ذلك. تبدو هذه التشريعات معقولة إلا أنها غير عملية عند التطبيق، إذ إن التبعات المادية المترتبة على تطبيق هذه النظم كبيره جداً على المُنتِج وتنعكس بالتالي على المستهلك حيث يُتوقع ارتفاع أسعار السلع المصنَّعة بنسبة 3–5%. إن الاتحاد الأوروبي ومعظم الدول المتطورة يواجهون صعوبات جمة في إرضاء التدابير الإحترازية الوقائية التي تتطالب بها الجماعات الضاغطة المناهضة للكائنات المعدلة وراثياً. هذا وقد استنتجت الجمعية الملكية في كندا في العام 2002 أن تعديل المعلومات على غلاف المنتج الغذائي من أجل ذكر التعديل الوراثي لا يستند إلى أي تبرير علمي إلا إذا أظهرت التجارب العلمية خطراً أو تغييراً غذائياً ملموساً ناتجاً من المادة المعدلة وراثياً نفسها، ولا يوجد هكذا إثبات في الوقت الحالي. هذا ما أكدته أيضاً الجمعية الملكية في المملكة المتحدة، أي أن الأغذية المعدلة وراثياً لا تشكل خطراً على الصحة. لقد خضع الغذاء المعدل وراثياً لتحاليل وفحوص عديدة، أكثر من

غيرها من الأغذية، ولا يوجد ما يبين بأنها غير سليمة، فلم إذاً يسعى الاتحاد الأوروبي إلى تعطيل دور هذه التقانة الفعال لتوفير الغذاء للعالم؟ إن الأغذية المعدلة وراثياً قد طُوِّرت بشكل كبير في أمريكا الشمالية وقد تم تسويقها من قبل شركات شمال–أمريكية أيضاً، بينما كان الأوروبيون يعملون ببطء على تطوير هذه التقانة الزراعية، مما أدى بالأمريكان والكنديين للقول بأن هذه التشريعات الصارمة بشأن المعلومات على غلاف المنتج، هي مجرد طرق بالية لحماية أسواقهم وتجارتهم. وقد قام كل من الأمريكان والكنديين بادعاء قانوني أمام منُظّمة التجارة العالمية (World Trade Organization) مدعين بأن هذه التشريعات الصارمة غير عادلة، وأن عددا من الحكومات الأوروبية تطرح مسألة سلامة المستهلك لأغراض انتخابية بحتة وليس لأسباب علمية. فالكل يعرف بأن هذه التشريعات الصارمة لم تنتج من تخطيط سليم، مع صعوبة تطبيق بالغة تتطلب عملاً إدارياً معقداً يؤدي في النتيجة إلى زيادة أسعار السلع والضرر على المنتِج والمستهلك.

إن وضع المعلومات على غلاف الأغذية المعدلة وراثياً يشكل موضوع جدل ساخن ومرير وعقيم وغير مستند إلى معلومات واضحة. من المتوقع في المستقبل القريب أن تصبح معظم الكائنات الغذائية، وخاصة النباتات، مهجنة عن طريق الهندسة الوراثية، وذلك بحكم ضرورة تأمين الغذاء لسكان العالم المتزايد عددهم. "دعونا نعترف بصراحة، فمن دون التقانة الحيوية التي ستساعد المزارعين على إنتاج أكثر، سيكون هناك نقص حاد في الغذاء، وخاصة في الدول النامية".

لو تم وضع كل التفاصيل والخطوات المتعلقة بالتعديل الوراثي الذي مر به المنتَج لتعقدت المعلومات المدونة على الغلاف بشكل غير مقبول. إن حق المستهلك بالاختيار مُعتَرف به من قبل كل الدول أعضاء الاتحاد الأوروبي، ويقتضي ذلك حق المستهلك بالحصول على المعلومة، وواجب المصنِّع بالإعلام. لذلك لا بد من وضع المعلومات الواضحة على غلاف المنتج، بشكل مناسب وبدون تعقيد.

قامت لجنة حديثة من المختصين في هيئة الخبراء لمعهد تكنولوجيات الغذاء الأمريكي (US Institute of Food Technologists Expert Panel) باستنتاج

بأن تنمية وتطوير التقانة التي تشمل تأشيب الــDNA (أي الهندسة الوراثية) في إنتاج الغذاء هي ضرورة، وتؤمن الفوائد التالية للمجتمع:

- وفرة أغذية في العالم بكلفة أقل.
- استمرار تحسين القيَم الغذائية للنباتات، إضافة إلى توفير نباتات تحمل مواد خاصة ونادرة لتعويض نقص عنصر غذائي معين في شعب ما.
- فواكه وخضار تحافظ على نضارتها أثناء عمليات التخزين لمدة أطول (Improved shelf-life).
- تحسين وتنمية المحاصيل الزراعية عن طريق أساليب تساهم بتحسين القدرة الإنتاجية (Increased yield).
- تحسين نوعية التربة غير المنتِجة والملوثة بالسموم في الدول النامية إلى تربة زراعية خصبة.
- تطوير أساليب زراعية أكثر رفقاً بالبيئة وذلك بتحسين أداء المضادات الحشرية وترشيد الطرق المتبعة في استعمالها، ومعالجة النفايات الحيوانية بأقل ضرر، واستعمال الأراضي بشكل أفضل للتقليل من اجتياح الأراضي ذات الأهمية البيئية الفائقة كالغابات المطرية (Rain forest).

أما فيما يتعلق بالقلق من خطر البيئي والاقتصادي للأغذية المنتَجة عبر التقانة الحيوية وتأشيب الــ DNA فقد توصل الأخصائيون في هيئة خبراء المعهد الأمريكي لتكنولوجيا الغذاء (US Institute of Food Technologists Expert Panel) إلى الاستنتاجات التالية:

- إن الأغذية المستحدثة بهذه التقانة لا تشكل خطراً على البيئة، وليست لها سمية أكثر من الأغذية المنتَجة بطرق التهجين التقليدية.
- يجب أن يستمر مطوّرو التقنيات، والمنتجون والمصنعون، وهيئات الرقابة والتشريع بالفحوصات والتحاليل على سلامة المواد الغذائية المستحدثة بما في ذلك تقانة تأشيب الــDNA.

– تطوير برامج تساعد العالم أجمع، بما فيه الدول النامية، على الاستفادة من الفوائد الاقتصادية للأغذية السليمة المنتَجة عبر تقانة تأشيب الـــDNA.

4.1 تخطيط سياسة العمل Policy making

يتأثر التخطيط لسياسة العمل في الهندسة الوراثية في البلدان الصناعية مباشرة بمصالح الحكومات والقطاع الصناعي، والهيئات الأكاديمية المجموعات المناصرة للبيئة. "إذ بعد قرابة عقدين من الجدل والنقاش لازال الموضوع يدور بشكل أساسي حول ما إذا كانت النظم والتشريعات الحكومية تتعلق بصفات المنتَج المعدل بواسطة تقانة تأشيب الـــDNA، أم بالتقنية نفسها التي استُعملت؟" كما هو الحال مع التقنيات الأخرى، فإن النقاش الذي تثيره الهندسة الوراثية يشكل أرضية لاختبار القدرة على إدخال مقاييس اجتماعية–اقتصادية (Socio-economic) ومعايير اجتماعية–ثقافية (Socio-cultural) للتأثير في السياسات الحكومية، وهي ما تسمى بالمعيار الرابع. إذ بالنسبة إلى مؤيدي هذه الفكرة (المعيار الرابع) فان معايير الجودة والسلامة والنوعية تعد غير كافية وحدها لتحديد الخطر الكامن من التقنيات الحديثة المختلفة ومنتجاتها، ولا بد من مراعاة المعطيات الاجتماعية والأخلاقية.

إن هذة الفكرة والمقاربة لموضوع التشريع تلعب دوراً كبيراً في الحد من سرعة تطبيق الهندسة الوراثية في المجال الزراعي والبيئي، ولكن تطبيقات الهندسة الوراثية في المجال الحيوي–الطبي لم تتأثر وشهدت تقدماً سريعاً. "الملايين من الناس حول العالم تقبلوا الفوائد من وسائل التشخيص والأدوية التي وفرتها هذه التقانة الحيوية الحديثة". من الأمثلة على منتجات طبية للهندسة الوراثية هناك مادة الأريثروبوتين (Erythropoietin) المهمة بالنسبة إلى المرضى الذين يقومون بغسل الكلي، ومادة الأنسولين لمرضى السكري، كما أن المكسب المهم هو تطوير طرق تشخيص أمراض مهمة كفيروس النقص المناعي المكتسب (HIV) وفيروس الالتهاب الكبدي (Hepatitis viruses)، ما يساهم بتجنب التلوث الناتج من نقل الدم. أما في مجال الزراعة، فقد لاقى إنتاج هرمون النمو المسمى الـــ Bovine

somatotropin (BST) معارضة شديدة من قبل المناهضين للهندسة الوراثية، في حين أن نفس الطريقة اعتُمدت لإنتاج الأنزيم البقري كيموسين (Chymosin) الذي يُخثّر الحليب عند التجبين، وذلك بدون أية معارضة، بل كان الصمت الكامل، علماً أن الكيموسين المنتج بواسطة الهندسة الوراثية يغطي 40-45% من احتياجات السوق الأمريكي، وبذلك تم الاستغناء عن ملايين من عجول الأبقار الرضع التي كانت تستعمل لاستخلاص الأنزيم.

أخيراً، إلى أيّ مدى سيلعب المقياس الرابع دوراً في تحديد السياسة والنظم الزراعية والبيئية المتعلقة بالهندسة الوراثية؟ لا شك أن الموضوع على مفترق طرق بالغ الأهمية. وعليه، فإننا بحاجة إلى تثقيف العامة في المجال العلمي، وفي الوقت نفسه لا بد للرأي العام من أن يثق ويعتمد بشكل أساسي على مختصين وخبراء في التقنيات المعقدة.

5.1 مواضيع تثير قلق العموم Areas of significant public concern

1.5.1 الجينات الواسمة لمقاومة مضاد الحيوية

Antibiotic-resistance marker gene

إن التقنية الحالية لإدخال المورِّث الجديد إلى الخلايا النباتية ذات فعالية محدودة لجهة دخول واستقرار المورِّث المؤشب الجديد في الخلية المستقبِلة، إذ لا يتم ذلك إلا في عدد محدود من الخلايا، ويشكل ذلك صعوبة في تمييز وانتقاء وعزل الخلايا التي تحمل المورّث الجديد بشكل مستقر. لتخطي هذه المشكلة التي تواجهها هذه التقنية، تم تطوير طريقة تشخيص عن طريق استعمال مورّث "واسِم" يحمل صفة معينة (كمقاومة مضاد للحيوية أو مبيد عشبي)، ويتم لصق المورث الواسم مع المورث الجديد قيد الإدخال إلى الخلية النباتية. هذا ما يسمح فقط للخلايا التي دخل فيها المورِّث المؤشَّب الجديد مع المورث الواسم بشكل مستقر أن تنمو في وسط غذائي يحتوي على مضاد حيوي، بينما لا تستطيع باقي الخلايا غير المرغوب فيها من النمو. إن المورث الواسم المقاوم لمضاد الحيوي لا يلعب أي دور لاحقاً خلال زراعة النبتة المعدلة وراثياً. ومن أكثر المورثات الواسمة

استعمالاً خلال تحضير النبات المعدل وراثياً الــntpII الذي يحمل صفة مقاومة مضاد الحيوية كنامايسين (kanamycin) ونيومايسين (Neomycin). بالنظر إلى الماضي بناء على المعلومات الحالية، كان الأجدر عدم استعمال هذه الطريقة المخبرية لإنتاج محصول تجاري.

السؤال الذي سيطرح نفسه هنا، هل يمكن للمورث الواسم أن ينتقل من النبات المعدل وراثياً أو من الكائنات المجهرية إلى الأحياء المجهرية الموجودة في أمعاء الإنسان، مما يسبب زيادة في مقاومة مضادات الحيوية (Antibiotic resistance) في الشعوب التي تستهلك نباتاً معدلاً وراثياً؟ إن مقاومة البكتيريا لمضادات الحيوية هي ظاهرة متكررة في كل أنحاء العالم، والأغلب أن السبب الأساس لذلك هو انتقال المورث المقاوم لمضاد الحيوية بين البكتيريا، ثم يتبع ذلك عملية ضغط الانتقاء (Selective pressure) الناتج من استعمال مضاد الحيوية. "لم يثبت لغاية الآن أن المورث الواسم المقاوم لمضاد الحيوي، الموجود في النباتات المعدلة وراثياً، قد انتقل إلى كائنات حية موجودة في أمعاء الإنسان أو الحيوان". ولكن ذلك محتمل الحصول، ويجب أن لا نتجاهله. لقد حددت النظم في الاتحاد الأوروبي العام 2006 كتاريخ نهائي للكف عن استعمال المورثات الواسمة المقاومة لمضادات الحيوية المستعملة طبياً. كما يجري العمل الآن على إزالة المورثات الواسمة المقاومة لمضاد الحيوية من المحاصيل المعدلة وراثياً. ومن المفترض بأن تساعد الطرق الجديدة على إزالة تلك المورثات وخفض كمية الــDNA المؤشب المضاف إلى النبتة.

2.5.1 انتقال مثيرات التحسس Transfer of allergens

إن التحسس أو الحساسية لبعض الأطعمة (Food allergies) تحصل عندما يتحرك الجهاز المناعي ضد مادة معينة من الغذاء تكون في معظم الأحيان بروتينا أو كلايكوبروتين (كاربوهيدرات معقد متحد مع البروتين Glycoproteins). تشكل الحساسية الغذائية خطراً يشغل بال الكثيرين، بالأخص التحسس من الفستق السوداني (Peanut) والبندق والجوز وثمار أخرى من نفس

العائلة (Tree nuts) التي تسبب في حالات عديدة تفاعلاً مناعياً تحسسياً حاداً (Anaphylactic shock). وعليه فإن المعلومات على غلاف المنتج تشير دائماً بشكل واضح إلى وجود تلك المحتويات، وخاصة الفستق السوداني. من جهة أخرى فإن للنباتات المعدلة وراثياً قدرة عالية على التغيير من خلال تخطي العوازل بين الأنواع (Species) وذلك من خلال التلقيح بين الأصناف المتقاربة، مما قد يُسبب إدخال مادة بروتينية إضافية للأغذية المعدلة وراثياً، حيث يمكن لهذا البروتين التسبب بالحساسية للمستهلك. لقد أصبح من الضروري بشأن النباتات المعدلة وراثياً التأكد من عدم انتقال مواد مثيرة للتحسس بين نوع نباتي معط وآخر متلق. بلا شك أن هذه عملية معقدة، وقد تم تنبيه كل المنتجين للنباتات المعدلة وراثياً لإعطاء الموضوع أهمية قصوى. أخيراً لا بد من القول بأنه لم تُسجّل حتى الآن حالات وجود مواد مثيرة للتحسس ناتجة من تقانة تأشيب الـــDNA.

تتوفر حالياً قواعد بيانات إلكترونية مصنفة تقوم بالتعريف بالبروتينات المثيرة للحساسية أو التي قد تسبب مشاكل عند إدخالها على المواد الغذائية. لقد تم الترخيص لاستعمال الذرة المعدلة وراثياً المعروفة باسم StarLink™ لتغذية الحيوانات من دون الاستهلاك البشري، وذلك لوجود البروتين Cry9c (بروتين مسم يقتل الحشرات) في تركيبته، ولم تختف كمية هذا البروتين من المحصول بالسرعة المطلوبة أثناء الاختبار، بعكس البروتينات الأخرى. لقد أثير جدل وانزعاج كبير من المنتجات المعدلة وراثياً عندما استُعمِلت كميات قليلة من ذرة StarLink™ في منتج التاكو Taco shells. وبالنظر إلى الماضي، كان الأجدر بشركة أفانتس (Aventis) عدم تسويق منتجات من الذرة غير المرخصة للاستهلاك البشري، إذ أصبح من الصعب التشخيص والعزل والفصل بين المحاصيل بشكل موثوق. على إثر ذلك قامت وكالة الغذاء الأمريكية US FDA بتطوير طريقة تشخيص تعتمد على استعمال الأجسام المضادة (Antibody assay) لتحديد الحساسية اتجاه بروتين الـــ Cry9c مقارنة بعينات ضابطة، وكانت النتيجة عدم حدوث تفاعل تحسسي مرتبط بهذا البروتين. ولكن ما حصل مع الـــStarLink™ قد شوّه صورة النباتات المعدلة وراثياً عند الرأي العام، وبنفس الوقت ألقى الضوء على عدة مواضيع مهمة، منها:

- إن النظم والتشريعات الضابطة لتسويق المواد المعدلة وراثياً والسارية في الولايات المتحدة الأمريكية غير مناسبة ولا وافية.
- هناك تعاطٍ غير مسؤول في التداول لبذور النباتات المعدلة وراثياً من قبل بعض الشركات أو المزارعين.
- هناك مشكلة تتطلب تطوير نظام تسويق يميز المنتجات المعدلة وراثياً غير المرخصة للاستعمال في سلسلة الغذاء في الولايات المتحدة الأمريكية.
- دور الحكومة في التأكد من سلامة إمداد الحبوب.
- أسلوب اتخاذ القرارات بالتسويق من قبل العاملين في القطاع الصناعي المرتكز على التقانة الحيوية.
- التأثير السلبي في تقانة التعديل الوراثي.

نأمل بأن هذه الحادثة العابرة بشأن الكائنات المعدلة وراثياً وسوء تدبيرها قد شكل إنذاراً للشركات العاملة بهذا المجال، أي شركات التقانة الحيوية، شركات إنتاج البذور، المزارعين والعاملين على المراقبة وتنفيذ القوانين، كي يضمن استعمال الطرق السليمة في كل خطوات الإنتاج الغذائي. وفي حال تكرار تلك الأخطاء، فسيشكل ذلك خطراً حقيقياً على مستقبل المنتجات المعدلة وراثياً وتسويقها.

3.5.1 انتشار وانتقال حبوب الطلع من النباتات المعدلة وراثياً

Pollen transfer from GM plants

هناك قلق بشأن السلامة الصحية للأغذية المعدلة وراثياً، وهناك أيضاً قلق من التسبب بأضرار بيئية نتيجة الكائنات المعدلة وراثياً. "لقد تمت الدراسة العملية بالتجارب حول احتمال انتقال المورِّث الجديد، المضاف إلى النبات المعدل وراثياً، إلى الأصناف البرية الشبيهة. إذا أخذنا بعين الاعتبار كل المحاصيل المنتجة سابقاً بالطرق التقليدية فإن هناك أمثلة قليلة جداً على حصول انتقال مورثات عن طريق حبوب الطلع، وذلك لأن النبات الناتج من ذلك ذو طبيعة واحتياجات خاصة لجهة التكاثر والنمو، ولا يقدر بالتالي على مزاحمة الأعشاب البرية (Wild plant)".

هل يمكن أن ينتقل مورِّث مقاومة مبيدات الأعشاب أو الآفات من النبات المعدل وراثياً إلى نبات أو فصيلة مشابهة مسبباً زيادة في قدرته على التكاثر والانتشار بشكل خارج عن السيطرة؟ لا بد من القول بأنه نادراً ما تنتقل الجينات عن طريق حبوب الطلع بين النباتات المتشابهة في الظروف الاعتيادية، والظاهر أن الوضع هو نفسه مع النباتات المعدلة وراثياً، إذ لا دلائل علمية على الانتقال. بالمجمل، هناك إمكانية انتقال المورِّثات عبر حبوب الطلع نظرياً، ولكن من الناحية العملية سيكون احتمال ذلك ضئيلاً جداً، ويكاد لا يترتب عليه أي قلق أو تبعات مهمة. وبالرغم من ذلك فإن كل النباتات المعدلة وراثياً التي تم نشرها في البيئة تخضع لمراقبة بشكل دقيق لتأكيد ذلك.

4.5.1 الزراعة الصيدلانية Pharming

هناك جهد متزايد للعمل على إنتاج بروتينات بشرية مسؤولة عن تنظيم الوظائف، التي تتواجد في الجسم عادة بتركيز قليل ما يجعل من الصعب استخلاصها بكميات وافية، على سبيل المثال الأنسولين. في السابق، كان المصدر الأساسي لتلك البروتينات هو أعضاء الأموات أو بنوك الدم. حالياً، مع الهندسة الوراثية التي حلت محل الطرق القديمة أصبح بالإمكان إنتاج سهل لتلك البروتينات وبكميات غير محدودة. ويتم ذلك من خلال نقل المورث المسؤول من خلية الإنسان (بعد كلونته) إلى خلية الكائن المجهري المستقبِل، فيصبح الكائن المجهري قادراً على إنتاج البروتين بالكميات المناسبة للاحتياجات. إن هذا المنتج سليم، تماماً، خالٍ من المواد الخطرة الملوثة، التي كانت تحصل في حالة الاستخلاص من أعضاء الأموات.

لعل أكثر المواضيع إثارة وعرضة للجدل، موضوع إنتاج مواد صيدلانية عن طريق التقانة الحيوية الزراعية، الذي يطلق عليه اصطلاح الزراعة الصيدلانية (Pharming). فالنبات المعدل وراثياً ينتج مواد صيدلانية مفيدة. "من المتوقع حصول نقص في إنتاج المواد البروتينية الطبية عن طريق التقنيات التقليدية، وعليه فإن تقبُّل النباتات المعدلة وراثياً سيكون أسهل وعلى نطاق واسع". ولكن من الناحية القانونية

هناك قلق ومخاوف جديدة ومبررة متعلقة بالسلامة الغذائية، وذلك إذا استُعملت أصناف النبات المُعدّ للغذاء في التعديل الوراثي بهدف الزراعة الصيدلانية.

إن آفاق وقدرات الزراعة الصيدلانية هائلة، ولكن الاهتمام ينصب في الوقت الحاضر على اختيار النبات المناسب الذي يستطيع أن ينتج المادة المطلوبة من دون أي خطر تلوث للنبات الذي يدخل في نظام التغذية.

5.5.1 مسائل اجتماعية وأخلاقية في موضوع الكائنات المعدلة وراثياً (النبات والحيوان)

Social, moral and ethical issues with plant and animal GMOs

في البداية كان القلق بشأن الكائنات المعدلة وراثياً يتمحور حول السلامة الصحية للإنسان والبيئة، ولكن في الوقت الحاضر هناك قلق آخر على مستوى أخلاقي واجتماعي يلعب دوراً في عملية اتخاذ القرار. إن الشركات المتعددة الجنسيات التي تعمل في مجال كيمياء الزراعة (Agrochemicals) تسيطر على سوق النباتات المعدلة وراثياً وإنتاج بذورها، وتسعى إلى تحقيق أرباح عالية لتغطية كلفة الاستثمار الباهظة، مما يحصر إنتاج النباتات المعدلة وراثياً بكبار المزارعين الذين يستعملون وسائل زراعية متطورة تؤمن الأرباح الوفيرة. "إن بذور النباتات المعدلة وراثياً عقيمة لا يقدر المزارع أن يكثِّرها. ولكن هذه الممارسة اعتيادية من قبل شركات إنتاج البذور عامة، فإن البذور المنتَجة للتجارة هي هجينه من الجيل الأول (F1 hybrid) الذي لا يتكاثر بشكل جيد، ما يجعل المزارع بحاجة إلى شراء البذور من الشركات في كل موسم كي يُنتِــج المحصول المطلوب. إن هذه العملية تضمن مردوداً مادياً مقبولاً للشركات المستثمِرة في إنتاج هذه البذور. من جهة أخرى، فإن النباتات المعدلة وراثياً المقاومة لمبيد حشري معين تجعل المزارع معتمداً كلياً على شراء مضاد الحشري حصرياً من الشركات التي تنتجه. يُؤمل أن يستفيد المزارع الفقير في الدول النامية، وبالمستقبل القريب، من تلك التطورات.

إن مفهوم الاستمرارية والبقاء (Sustainability) ذو تأثير اجتماعي مهم في بعض الدول النامية. على سبيل المثال، تم تطوير مواد جديدة مُحلِّية (حلوة

المذاق) ذات فعالية أعلى بأضعاف كثيرة من السكروز (Sucrose). وقد يترتب على ذلك تراجع لسوق السكر التقليدي المُنتَج من قصب السكر والبنجر أو الشّمندر السكري (Sugar beet)، مما قد يتسبب بمشاكل اقتصادية ومادية حادة وبطالة وصعوبات في إيجاد البدائل للمزارعين. ومثال آخر هو زيادة إنتاج الحليب من خلال حقن الأبقار باستمرار بهرمونات النمو البقري (BST) المُنتَج بالهندسة الوراثية، وهذا ما خلق صعوبات لصغار المزارعين لعدم قدرتهم على المنافسة. إن هذه الممارسة طبيعية في الولايات المتحدة الأمريكية حالياً، ولكن الاتحاد الأوروبي يسعى حالياً إلى وقف هذه الممارسة ومنع تطبيقها.

لا بد من التوقع أن انتشار التقانة الحديثة في الزراعة وفي إنتاج الغذاء سيتسبب بمشكلة بطالة، وربما ازدياد مستوى الفقر خاصة في الدول النامية. وهنا تتداخل مفاهيم وقيم مختلفة لتقييم الأمور والتوفيق بين الفوائد والحسنات التي تعود على المجتمع ككل مقارنة مع المساوئ. عليه، "يجب على الدول المتقدمة العمل على مساعدة وتطوير الدول النامية من الناحية التقنية والمالية، وذلك كي يتسنى لها الانضمام إلى هذه الثورة الزراعية". ويبقى التنفيذ الفعلي في يومنا هذا أمراً مختلفاً وموضوع تساؤل. ومن المحزن بأن إدراك الناس لهذا الموضوع قليل أصلاً، ولا تتم إثارته إعلامياً من قبل الناشطين الغربيين المناهضين للهندسة الوراثية.

في الوقت الحاضر نلاحظ أن قلق الرأي العام يتمحور حول الحيوانات المعدلة وراثياً (Transgenic animal) وهي الحيوانات التي تم إدخال مورث جديد من صنف حي آخر في خلاياها، وذلك عبر تقنيات الهندسة الوراثية. قد يعتبر البعض، ومن خلال خلفية دينية، هذا النوع من التعديل الوراثي بنقل مورث من نوع حي إلى آخر هو بمثابة كسر للقوانين الطبيعة الفاصلة بين الأنواع أو الأجناس غير المتشابهة، على اعتبار أن تلك الحواجز مهمة وذات قداسة لضمان عدم اختلاط الأنواع. بينما من وجهة نظر الفلسفة التصغيرية عند بعض العاملين في الأحياء الجزيئية، فإن المورث يعتبر الوحدة البنيوية للحياة، وما هو إلا عبارة عن تجمع مواد عضويه (وهي نفسها تتواجد في كل الخلايا الحية)، وإن هذه المواد

قابلة للتعديل والتغيير. بناء على ذلك فإن المؤيدين لهذه النظرة لا يرون حاجة إلى إقحام المسائل الأخلاقية في الموضوع الذي يهتم بنقل وتحويل الجينات بين الأنواع والأجناس المختلفة. لنتساءل الآن عن الفوائد من الاستمرار بالتعديل الوراثي للحيوانات ونعطي بعض الأمثلة:

1- هناك دراسات مستفيضة عن الحيوانات بهدف فهم مراحل التطور الجنيني وفهم دور المورثات المختلفة في هذا الإطار. إن تطوير الفأر المسمى أنكوماوس (Oncomouse) بهدف دراسة مرض السرطان ذو قيمة كبيرة في تطوير الدواء لعلاج السرطان عند الإنسان. ولكن الحقيقة أن الفأر المصاب بالسرطان خلال التجربة يموت نتيجة لهذه الدراسات، ما يشكل مسألة أخلاقية قيد النقاش.

2- لقد تم تحسين سرعة نمو الحيوانات والأسماك بواسطة نقل عدد من الجينات الخاصة لهذا الهدف، ويبقى السؤال هنا حول مدى تقبُّل هذه الأحياء المعدلة وراثياً في سلسلة الغذاء.

3- تمّت عملية إدخال جينات بشرية في الحيوانات الحلابة (Lactating animals) كالأغنام، ولاقى ذلك نتائج جيدة نالت الإعجاب. إذ إن تلك العملية لم تؤثر في الحيوانات وساعدت بإنتاج بروتينات بشرية ذات قيمة وفائدة كبيرة لصحة الإنسان، فهذه البروتينات البشرية يتم استخلاصها من حليب الحيوان المعدل وراثياً، إضافة إلى أن هذه المنتجات تلقى القبول عند العموم. ولا يُعتبر هذا الموضوع مثيراً للجدل عند الرأي العام وذلك لأن الحيوانات المعدلة وراثياً لا تستهلك في سلسلة الغذاء البشري مباشرة.

4- إدخال الجينات البشرية للحيوانات، بالأخص الخنزير، بهدف استخدام أعضائها أو أنسجتها أو خلاياها للزرع عند الإنسان، ويسمى ذلك بعمليــة زرع أعضــاء من جنس مختلــف أو زينوترانسبلانتايشن (Xenotransplantation) على سبيل المثال، فقد تم إدخال المورث البشري المسؤول عن البروتين Complement inactivation factors إلى

الخنزير لمنع التفاعل المناعي الحاد الذي يؤدي إلى رفض الأعضاء المزروعة (Acute hyper-Immune-rejection). بلا شك فإن هذا البرنامج جذاب ومهم حيث يعوض النقص في الأعضاء البشرية الضرورية للزرع. ولكن الجانب المقلق هو احتمال انتقال فيروسات الخنزير إلى الإنسان بعد الزرع، كما حصل مع الحملة التي صاحبت إنتاج هرمون BSE. هناك أيضاً جانب آخر يمكن أن يثير جدلاً أخلاقياً، ألا وهو تربية الخنازير بهدف زرع أعضائها للإنسان، وليس بهدف التغذية كما هي العادة!

5- إنتاج مؤشرات حيوية (Biomarkers) تُستعمل لتشخيص التلوث البيئي. فقد استعملت الديدان البدائية (Nematode) لهذا الغرض وهي محاولة تستحق الاهتمام.

6- استعمال الحيوانات المعدلة وراثياً كأنموذج (Model) مشابه لأمراض وراثية عند الإنسان، وذلك بُغية إجراء التجارب والبحوث لإيجاد العقاقير أو التوصل إلى العلاج الجيني.

في حين أن الكثير من الناس يعتبرون أن أهداف هذه التطورات العلمية ضرورية وذات قيمة للبشرية، هناك آخرون يُعبّرون عن تخوف حقيقي بشأن الطريقة التي تُعامل بها الحيوانات، وهل لنا الحق بالسماح بتعديل المورثات عند حيوان لتحقيق مصلحه للإنسان. إن القلق الأساسي للرأي العام هو الشعور القوي بأننا نُفقد الطبيعة طبيعتها (Unanturalness) عندما ندخل مورث إنسان في حيوان يتغير مخزونه الوراثي وينمو ويعيش حاملاً مورث الإنسان! من الصعب على الإنسان البسيط غير المختص أن يتفهم بأن الصفة التي ينقلها المورث هي بشرية، ولكن المصدر المُنتِج ليس الإنسان بل الحيوان". فأثناء الخطوات المخبرية للتعديل الوراثي، لا يتم نقل المورث مباشرة من المصدر المُعطي للمورث إلى الكائن المستقبِل بشكل مباشر، إنما تتم العملية من خلال انتساخ للـــDNA في الأنبوب (In-vitro cloning)، ففي هذه الطريقة تتم مضاعفة أو تكثير عدد النُسخ (Amplification) للمورث قيد النقل – عادة تتم هذه المرحلة بعد إدخال المورث

في البكتريا- ففي هذه الخطوات وتكاثر البكتريا يتخفف (Dilution) المورث الأصلي المأخوذ من الإنسان بنسبة لا تقل عن 10^{55} ضعف. وعليه فإن الــDNA الأصلي لا يُستعمل مباشرة ليُدخل إلى الكائن المتلقي، وإنما يُستعمل DNA مطابق له تم تصنيعه خلال عملية الانتساخ المشار إليها.

إن موضوع حقوق الحيوانات مثير للجدل، فالسؤال هل يملك الحيوان حقاً ذاتياً أم لا؟ البعض يعتقد بأن الحيوانات الواعية والحساسة، تملك نفس درجة حقوق التعامل الإنسانية، ولكن كيف نحدد مفهوم الوعي والحساسية وأين نضع الحد الفاصل؟ منذ عدة سنوات أصدرت اللجنة الاستشارية للأغذية المستحدثة والعمليات الجديدة (ACNEP, Advisory Committee on Novel Foods And Processes) محاذير أخلاقية بشأن الاستعمال الغذائي لأعضاء الحيوانات المعدلة وراثياً، والمحاذير هي كالتالي:

1- نقل مورث من حيوان محرم أكله عند بعض الأديان إلى آخر يؤكل (مثلاً من خنزير إلى نعجة) سوف يجرح مشاعر غالبية اليهود والمسلمين.

2- عندما إدخال مورث بشري إلى حيوان لحمه قابل للأكل، كما في حالة نقل المورث المسؤول عن بروتين العامل التاسع لتخثُّر الدم (Factor IX) إلى النعجة، فإن المنتَج مقبول لأغراض طبية صيدلانية فقط، ولا يجوز بحال أن يُستعمل لحم هذا الحيوان المذبوح للأكل، تفادياً لدخوله في سلسله الغذاء.

3- عندما ينقل مورث حيواني إلى نبات قابل للأكل (كما في حاله إنتاج اللقاحات)، فإن المنتَج يُستخدم لأغراض صيدلانية وطبية فقط، ولا يُستعمل هذا النبات ولا مشتقاته كغذاء بشري أو حيواني لتفادي دخوله في سلسلة الغذاء، خاصة للنباتين، وبالأخص منهم الذين يُحرمون أكل اللحوم والمشتقات الحيوانية (Vegans).

4- لا يجدر التفكير في استعمال كائنات حيه تحتوي على مورثات بشرية في تغذيه الحيوانات (على سبيل المثال الأحياء المجهرية الحاوية على مورث الأنسولين البشري للأغراض الصيدلانية).

بعد إجراء استشارات عن قرب مع هيئات دينية تمثل معتقدات مختلفة، تبين أنه ليس هناك اعتراض كبير يقتضي منع باتاً وتحريمًا للمنتجات الغذائية التي تحتوي على نسخة من مورث بشري. (وقد لوحظ ذلك بشكل ملموس بعد أن تم تفهم مبدأ طبع المورث أو انتساخه (Gene copy). ولكن تقرير الاستشارات أكد عدم تشجيع نقل بعض المورثات ذات حساسيه أخلاقية، وخاصة إذا توفرت تقنية بديلة أخرى). في حال كان الكائن المعدل وراثياً يحتوي على نسخة من مورث غير مقبول عند بعض الشعوب لأسباب دينية وتَحتَّم إدخاله في الغذاء، فلا بد عندها من الإشارة إلى ذلك بشكل واضح ضمن المعلومات على غلاف المنتج.

6.5.1 أخلاقيات الهندسة الوراثية Genethics

منذ بدء المراحل الأولى لمشروع مسح جينات الإنسان Human Genome Project (الذي يقتضي تحديد تسلسل القواعد لكل الصبغيات) هناك توقع بأن يثار الكثير من الجدل على الصعيد الأخلاقي والاجتماعي والقانوني والنفسي، كالذي يمكن أن ينتج من دراسات مرتبطة بفحص الجينات (Genetic testing) وقواعد المعلومات الوراثية (Genetic databases)، والمسح الجيني الشامل (Genetic screening)، والعلاج الجيني على الخلايا التكاثرية بمراحل نمو أولية (Germ-line gene therapy)، والكلونة (Cloning)، ونقل الأعضاء بين الأصناف (Xenotransplantation) ونقل الخلايا الجذعية الجنينية (Embryonic stem cells) من الحيوان إلى البشر أو العكس، انظر جدول (4.1). بشكل عام كل ما تثيره هذه الدراسات يندرج في مجال أخلاقيات الهندسة الوراثية (Genethics). في حين أن الاستمرار في دراسة الجينوم البشري ستبقى من الضروريات، فإن احتمال ارتداد أصداء وردات فعل مهمة تطرح الكثير من التساؤلات المتكررة عن مدى سِرِّيَة وخصوصية المعلومات عن مورِّثات شخص، ومدى موافقة المجتمع على إمكانية القيام بمسوحات واستفسارات وراثية من شأنها وصم الأشخاص بسبب مورثاتهم، وما يترتب على كل هذه الدراسات أو الفحوص من نفقات مالية.

الجدول 4.1 : مواضيع الجدل والقلق عند الرأي العام حول البحث الجينومي البشري
سرية نتائج الفحوص والمسح
المجالات التي يسمح فيها للفحص والمسح
التمييز العنصري أو التشويه الاجتماعي والوصمات البغيضة
الاستغلال التجاري لمعلومات تخص جينات الإنسان
الضغوط لتحسين النسل (Eugenics)
تأثير العلاج الجيني الذي يستعمل الخلايا التكاثرية بمراحل نمو أولية (في مراحل الجنين الأولى) في الأجيال القادمة.

ربما في القريب سنحصل على هويه وراثية مكتملة للأشخاص (Individual genetic portfolio) بحيث نتمكن من توقع وتشخيص مبكر للأمراض المستقبلية عند شخص ما، كأمراض القلب أو السرطان، وعليه نتمكن من إعطاء نصائح وعلاج مبكر قبل بداية المرض. وقد اقتُرِح بأن يتم الفحص أو المسح الوراثي فقط عندما يتوفر علاج للحالة المرضية التي تم فحصها. وفي حالات الأمراض الوراثية الموجودة سابقاً في عائلة ما، فمن الممكن وفي حالات محدودة فقط إجراء فحص قبل الولادة (Per-natal) لمعرفة ما إذا كان الجنين حاملاً المورث المُمْرِض أم لا. على ضوء النتيجة يقرر الأبوان إما إنهاء عملية الحمل وإما المتابعة والتهيؤ لمتطلبات الحالة المرضية للمولود القادم.

لعل أكثر جوانب الفحص الوراثي سوءاً وفساداً هو أن تُستغل المعلومات الوراثية لشخص ما من قِبَـــل أرباب العمل وشركات التأمين والرهن. إذ إنه من المؤكد أن المعلومات الوراثية عن الموظف تساعد في انتقاء الموظفين الأصحاء ذوي الإنتاج العالي، وهو المطلوب من جهة العمل والاقتصاد، ولكن هذه المعلومات الوراثية نفسها ستُحدث أثراً وكارثة على مصلحة صاحبها، خاصة أن

الأمراض المتوقعة بناء على المعلومات الوراثية ربما لن تتحقق بالمستقبل. إن اللجان المهتمة بأخلاقيات الهندسة الوراثية تقترح عدم السماح لشركات التأمين والرهن والمؤسسات المالية المشابهة بطلب المعلومات الوراثية عن شخص ما كشرط لإبرام العقود والقروض أو التأمين على الحياة. ولكن ربما سيكون ذلك خارجاً عن سيطرة صاحب العلاقة، وإذا تم السماح بذلك فستكون العواقب وخيمة.

من المتوقع أن يؤدي العلاج الذي يعتمد على المورثات أي العلاج الجيني (Gene therapy) دوراً مهماً جداً في علاج الأمراض الوراثية. هناك محاولات تطبيق محدودة للعلاج الجيني على الخلايا جسدية غير جنسية (Somatic, non-sexual cell)، وقد لاقت نجاحاً محدوداً، ولا زالت تحت المراقبة والمتابعة لتبيان مدى سلامتها صحياً وقانونياً ومدى تقبل الرأي العام لها. أما استعمال الخلايا الجنسية (Germ-line) كالحوين المنوي أو البويضة، فهو ممنوع قانونياً لأنه غير مقبول اجتماعياً ولا أخلاقياً لما يسببه من نزعة وضغوط لتحسين النسل والنوع (Eugenics).

إن احتمال استخدام الخلايا الجذعية أو الجذرية (Stem cells) التي هي خلايا أولية غير متخصصة ولا متميزة، ومستخرجة غالباً من بويضة ملقحة وحيدة، في الطب التجديدي (Regenerative medicine) يفتح الأمل لشفاء أمراض عديدة كالسكري، وألالزهايمر (Alzheimer's) وغيرهما. هذا وقد تفتح الخلايا الجذعية الطريق للعلاج باستنساخ الأعضاء كالقلب والكلية (Therapeutic cloning) واستعمالها للزرع (Transplantation). وهنا تواجه الفكرة حماسًا واستحسانًا من قبل المستفيدين من زرع الأعضاء، بينما يعارض آخرون على خلفية أخلاقية. ولكن من دون شك، ستعطي هذا الموضوع القيمة العالية من جديد نظراً إلى أهميته البالغة بالنسبة إلى علاج المرضى.

وأخيراً، لا بد من القول والتنبيه إلى أن الحماس المفرط عند البعض لهذه التقانة يجعلهم ينتظرون من الطب الحيوي (Biomedicine) إنجازات غير واقعية بتاتًا في علاج الأمراض والشيخوخة. إن العناوين الصحفية البراقة توهم الناس

بقرب اكتشاف علاجات جذرية للأمراض بواسطة التقانة الحيوية المبدعة، وبالتالي تُدخل المرضى والمسنين في أوهام عن آمال غير واقعية. نحن نعلم بأن التقانة الحيوية ستنجز الكثير، ولكن لا يجب أن تتحول التقانة الحيوية إلى مفهوم إيماني مطلق.

6.1 استنتاجات Conclusions

لا زالت الفوائد والأضرار للكائنات المعدلة وراثياً موضوع دراسة وأبحاث. لقد ساهم البحث العلمي الأساسي (Basic research) المتعلق بطبيعة المورثات وعملها وكيفية نقلها بين الكائنات إلى تطوير الهندسة الوراثية وتقانة تعديل المورثات. على نفس المنوال، فإن ازدياد المعلومات الأساسية حول تصرف المورثات وتصرف الكائنات المعدلة وراثياً سيساهم في حل عقدة المخاوف بشأن السلامة الصحية المرتبطة بالكائنات المعدلة وراثياً وتأثيرها في البيئة.

7.1 مراجع للتوسُّع Further reading

يمكن الرجوع إلى المصادر التالية من أجل الحصول على وجهات نظر مختلفة فيما يخص سلامة استخدام التقانة الحيوية والكائنات المعدلة وراثياً على المجتمع.

Atherton, K. T. *Genetically Modified Crops: Assessing Safety*. London: Taylor and Francis, 2002.

Dale, P. J. “The GM Debate: Science or Scaremongering?.” *Biologist*: vol. 47 (2000), pp. 7-10.

Frewer, L. K. and R. Shepherd, “Ethical concerns and risk perceptions associated with different applications of genetic engineering: interrelationship with the perceived need for regulation of the technology.” *Agriculture and Human Values:* vol. 12 (1995), pp. 48-57.

Horlick-Jones, T., J. Walls and G. Rower [et al.]. *A Deliberative Future? Public Debate about Possible Commercialisation of Transgenic Crops in Britain, 2003*, Understanding Risk Working Paper 04.02. Norwich: Centre for Environmental Risk, 2004.

Konig, A. A "Framework for designing transgenic crops: science, safety and citizen's concerns." *Nature Biotechnology*: vol 21 (2002), pp. 1274-1279.

Lawrence, S. "Agbio keeps on growing." *Nature Biotechnology*: vol. 23 (2005), p. 281.

Miller, H. "Cat and mouse in regulating genetic "enhancement"." *Nature Biotechnology*: vol. 23 (2005), pp. 171-172.

Moore, P. "A profile." *Nature Biotechnology*: vol. 23 (2005), p. 280.

OECD. *Safety Evaluation of Food Derived by Modern Biotechnology* : Concepts and Principles. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 1993.

Poortinga, W. and N. F. Pidgeon, *Public Perceptions of Genetically Modified Food and Crops, and the GM Nation? Public Debate on the Commercialisation of Agricultural Biotechnology in the UK*, Understanding Risk Working Paper 04.01Norwich: Centre for Environmental Risk, 2004.

Smith, J. E *Biotechnology*. 4th ed. *Studies in Biology*. Cambridge, MA: Cambridge University Press, 2004.

The Royal Society. *Genetically Modified Plants for Food Use*. London: The Royal Society, 1998, pp. 1-16.

The Royal Society. *Genetically Modified Plants for Food Use and Human Health: An Update*. London: The Royal Society, 2002.

الفصل الثاني

الكيمياء الحيوية وفسلجة النمو وعمليات الأيض

Biochemistry and Physiology of Growth and Metabolism

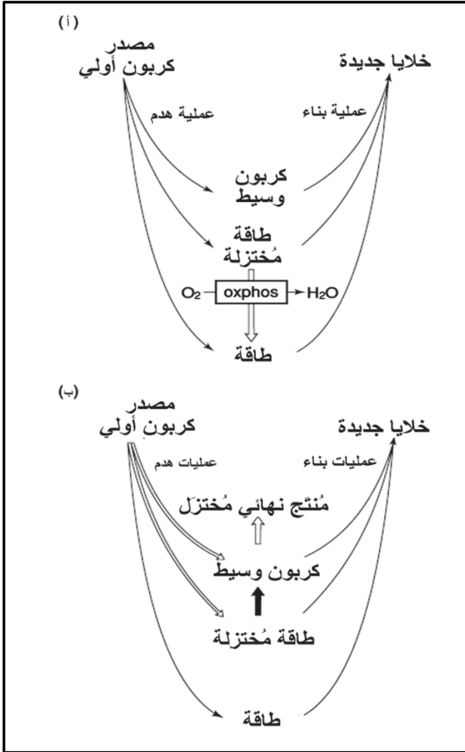
كولن راتليج | Colin Ratledge
جامعة هَلّ، المملكة المتحدة | University of Hull, UK

1.2 المقدمة Introduction

إذا كان هناك من قانون أساسي في علم الأحياء، فإنه ينصٌ على أن الهدف الأساس الذي يسعى إليه كائن حي مجهري هو إنتاج كائن حي مجهري آخر، أي التكاثر. في بعض الحالات يرغب العاملون بالتقانة الحيوية والذين يستغلون هذه الكائنات المجهرية في تجاربهم، بأن تتم عملية التكاثر تلك بأسرع ما يمكن، وذلك بهدف الحصول على أكبر عدد ممكن من الكائنات في نهاية التجربة. أما في حالات أخرى حيث يكون الهدف الأساسي هو مادة تُنتجها تلك الأحياء، وليست الكائن الحي بحد ذاته، عندئذ سيجهد العاملون بهذه التقانة لجعل الكائنات تنتج المادة المطلوبة وتحويل تلك الكائنات عن هدفها الأساسي، ألا وهو التكاثر والانقسام. عندها ستحاول الكائنات مقاومة العقبات المفروضة على قدرتها على الانقسام، ومن خلال ذلك تبدأ بإنتاج المادة المطلوبة. إن عملية نمو هذه الكائنات وعملية إنتاج

مواد مختلفة ومتنوعة هما عمليتان متشابكتان ومترابطتان ببعضهما البعض من خلال الأيض (Metabolism).

لم نحاول في هذا الفصل التركيز على شرح البُنية الخلوية للكائنات المجهرية الأساسية كالبكتيريا والخمائر (Yeast) والفطر (Fungi) والطحالب المجهرية (Microalgae)، إذ إن هكذا معلومات تتوفر في معظم مراجع علم الأحياء، ولا بد من العودة إليها عند الحاجة إلى إيضاح خصائص البُنية الخلوية. ولكن تلك مراجع نادراً ما تُوضِّح تفاصيل عمليات الكيمياء الحيوية (Biochemistry) التي تجري داخل تلك الكائنات الحية، وتشكل أساسًا لعملية التكاثر. بالطبع لا بد من فهم تام لعمليات الكيمياء الحيوية للكائنات المجهرية إذا ما أردنا حُسن استغلال قدرتها التكاثرية والإنتاجية.



الشكل 1.2 : عمليات التكسير والهدم (Catabolism) والتركيب والبناء (Anabolism) وصِلتها بإنتاج الطاقة وتوفير طاقة الاختزال. (أ) الأيض الهوائي phosphorylation) Oxidative الأكسدة والفسفرة) (أنظر الفقرة 5.2) . (ب) – الأيض اللاهوائي.

لقد عرضنا في هذا المرجع الكيمياء الحيوية في إطار تبيان التغيرات الكيميائية الحاصلة خلال عملية النمو الخلوي والانقسام. أما عملية الفسلجة (Physiology) في الخلية، فهي تذهب أبعد من الكيمياء الحيوية التي تنحصر فقط في وصف عملية تبادل أو انسياب عنصر الكربون والتغيرات الحاصلة للعناصر الأخرى، إن

الفسلجة تُبيِّن العلاقات التي تربط كل تلك العمليات والتفاعلات بعملية النمو بكليتها. وعليه فإنه يتوجب اعتبار وفهم التغيُّرات الكيميائية الحيوية ضمن نظام ثلاثي الأبعاد يمثل الخلية نفسها، ويضاف إليها البعد الرابع الذي هو عامل مرور الوقت. إذ لا تقوم الخلية بكل التفاعلات الممكنة بنفس الوقت، فبعض تلك التفاعلات يحصل أثناء النمو السريع، والبعض الآخر يحصل أثناء النمو البطيء أو حين تدخل الخلية فترة ركود وسبات. وعليه فإن الفسلجة هي الفهم المتكامل للتغيرات الكيميائية داخل الخلية ودورها في تطوير الخلية ونموها ودورة حياتها التكاثرية.

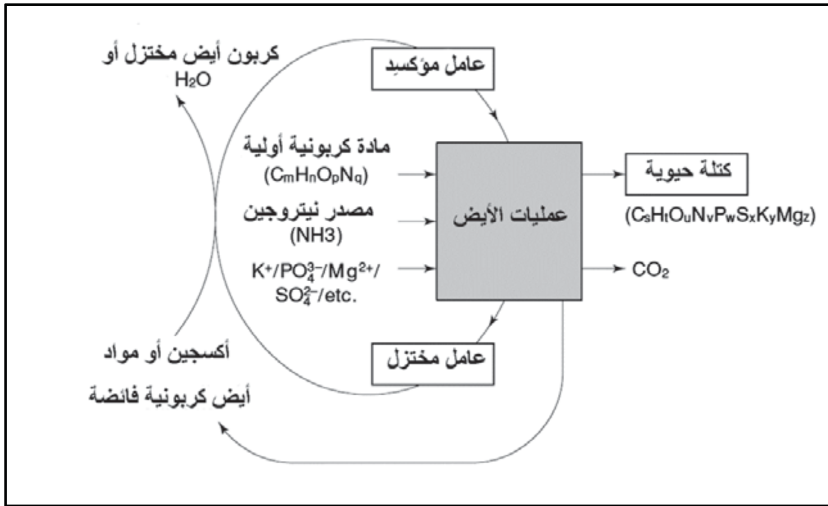
2.2 عمليات الأيض Metabolism

1.2.2 تعريف المصطلحات Some defintions

تُعتبر عملية الأيض قالباً متكاملاً يَنتج من مزيج من عمليتين متداخلتين ومترابطتين ولكنهما متعاكستان (انظر الشكل 1.2). أما النوع الأول فهي عمليات بناء وتركيب (Anabolic processes)، تتولى تصنيع مركبات الخلية الرئيسية من بروتين، وأحماض نووية (Nucleic acids)، ودهون، وكربوهيدرات (Carbohydrates)، كما تتولى أيضاً تركيب المواد الوسيطة والجزيئات السالفة (Intermediate precursors) كالأحماض الأمينيه، البيورين (Purines) والبايريميدين (Pyrimidines)، والأحماض الدهنية (Fatty acids)، والسكريات المتنوعة وفوسفات السكر (Sugar phosphate). وعمليات البناء هذه هي بالإجمال عملياتٌ مُستهلِكةٌ للطاقة وتسمى (Endothermic)، أي مُمتصَّة للحرارة. وهي تحتاج أيضاً إلى مصدر طاقة مُختزِلة، الذي لا بد أن يَنتُج من عملية هدم وتكسير المواد الأولية أو المخزون (Feedstock).

يتم تأمين الطاقة المطلوبة لهذه العمليات المُمتصَّة للحرارة من خلال مجموعة تفاعلات موازية مُنتِجة ومحررة للطاقة (Energy yielding)، وذلك من خلال التكسير والهدم (Catabolic)، (انظر الفصل الثالث). فعملية تكسير مركبات الكربوهيدرات كالسكروز أو الكلوكوز تولِّد غاز ثاني أكسيد الكربون والماء، وتُحرر الطاقة وتؤمِّن الطاقة المُختزِلة (Reducing power) التي تُستثمَر في

عمليات البناء والتركيب. هذا التفاعل الذي يُنتج ويُحرر حرارة يسمى (Exothermic)، وبانتهائه يكون الهدف من التفاعل قد تحقق. وينطبق هذا المبدأ على كل المواد التي تقوم الكائنات المجهرية باستعمالها. إن عملية الهدم والتكسير هذه لا تقوم فقط بإنتاج كربون للخلايا الجديدة، إنما تُنتج أيضاً الطاقة الضرورية والطاقة المُختزِلة لتحويل مواد الأيض إلى جزيئات كبيرة (Macromolecules) للخلية. تُشكل هاتان العمليتان من الهدم والبناء المتوازن والمتوازي عمليات الأيض في الخلية (Metabolism).



الشكل 2.2: التوازن في حركة الطاقة الحرارية (thermodynamic) المستعملة في الخلية أثناء عمليات الأيض.

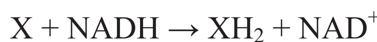
يمكن التمييز بين الكائنات التي تقوم بعمليات أيض هوائية (Aerobic) مُستَعمِلةً الأكسجين O_2 من الهواء، والكائنات التي تقوم بعمليات أيض لاأكسجينية (Anoxic)، أي من دون أكسجين. والحصيلة الإجمالية للتفاعل بين مركبات الكربون المُختزَل مع الأكسجين هي ماء وثاني أكسيد الكربون إضافة إلى مستوى عال من الإنتاج الحراري (Exothermic).

وعليه فالكائنات الهوائية تقوم بموازنة الأيض، إذ تستخدم كمية أقل نسبياً، مقارنة بالكائنات اللاهوائية، من المواد الأولية في عملية الهدم من أجل تأمين متطلبات عملية البناء والنمو، (انظر الشكل 19.2). بما أن التكسير بدون أكسجين

ذو فعالية قليلة لجهة إنتاج الطاقة، فإن الكائنات اللاهوائية تستهلك مواد أولية (Substrate) بكمية غير متناسبة مع كمية البناء والتركيب، حيث تُنتج طاقة قليلة وتستهلك نسباً عاليةً من المواد الأولية في عملية الهدم كي تتمكن من الحفاظ على استمرار مستوى معين من النمو الخلوي (انظر الشكل 16.2).

ويمكن إيضاح الفرق باستخدام كائنات حية كالخمائر، ومنها خميرة السكارومايسيس سيريفيسييه (Saccaromyces Cerevisae) وهي كائنات لاهوائية اختيارية (Facultative anaerobe)، أي أنه يمكنها النمو في أجواء هوائية، وكذلك في أجواء لاهوائية على حد سواء. تستهلك هذه الخلية الكلوكوز بطريقة هوائية مُنتِجة غاز ثاني أكسيد الكربون والماء ونسبة عالية من الطاقة، وتتكاثر بنسبة عالية مقارنةً بالأجواء اللاهوائية، حيث تستهلك الخلية الكلوكوز مُنتِجةً طاقةً حراريةً أقل وطاقةً مُختزِلةً أقل، وعليه يكون التكاثر وإنتاج الخلايا الجديدة أقل مقارنة بحالة النمو الهوائي. إضافة إلى ذلك، ومن دون الأكسجين، فإنه ليس من الممكن للخلية اللاهوائية أن تقوم بعملية أكسدة كاملة للطاقة المُختزِلة الناتجة أثناء عمليات الأيض الهدمي. يترتب على ذلك فائض من المواد الكربونية الوسيطة (Carbon intermediates) كحمض البايروفيك (Pyruvic acid) في خلية الخميرة، الذي لا بد من اختزاله للتمكن من إرجاع وإعادة استعمال الجزيئات المُختزِلة (الشكل 2.2)، ويكون المنتج النهائي في حالة الخمائر هذه هو الإيثانول (Ethanol).

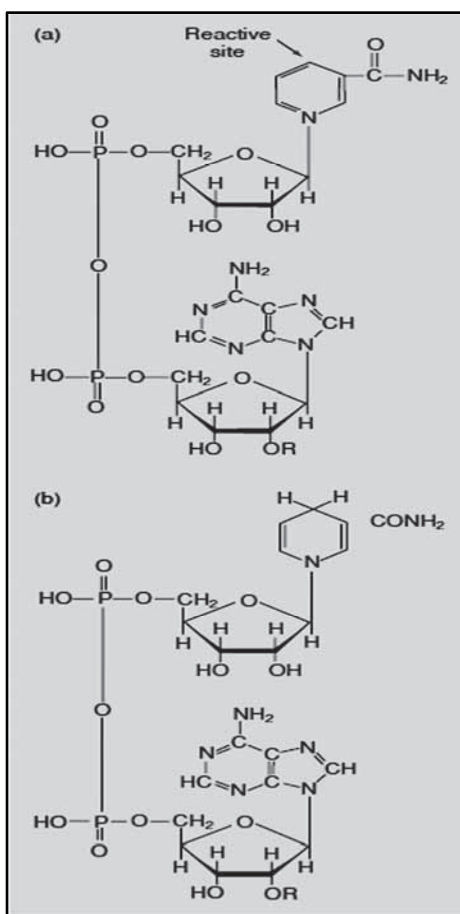
وعليه فالتفاعل المذكور يمكن تلخيصه بالمعادلة التالية:



$$X + NADH \rightarrow XH_2 + NAD^+$$

حيث تُمثل X المواد الأولية المراد تمثيلها والــNADH هي المادة المُختزِلة والــNAD^+ هي الشكل المؤكسَد للمادة المُختزِلة (الشكل 3.2 "أ" و"ب"). NAD هو مختصر نيكوتيناميد أدنين ثنائي النيوكليوتايد (Nicotinamide adenine dinucleotide). إذاً، الشكل المُختزَل من NAD هو NADH. هناك أيضاً الشكل المفسفر (Phosphorylated) من الــNAD^+ وهو $NADP^+$ والذي يُمْكِن

اختزالُه إلى NADPH، والذي يمكن أن يقوم بدوره كمادةٍ مُختزِلةٍ، ويكون ذلك في الأغلب أثناء التفاعل اللاهوائي الحاصل داخل الخلية. بينما يدخل الـــNADH في تفاعلات التكسير والهدم. تتوفر هذه المواد الأربع المذكورة NAD^+، $NADP^+$، NADH، وNAPPH في كل الخلايا ذوات التفاعل الهوائي واللاهوائي على حد سواء، ففي الخلايا ذات التفاعل الهوائي تُعاد أكسدة الـــNADH والـــNADPH من خلال ارتباطها بالأكسجين، ويتعذر ذلك في الخلايا ذوات التفاعل اللاهوائي، لذا يتطلب استراتيجية أخرى هنا لإعادة أكسدة هذه المواد (انظر الفقرة 6.2).

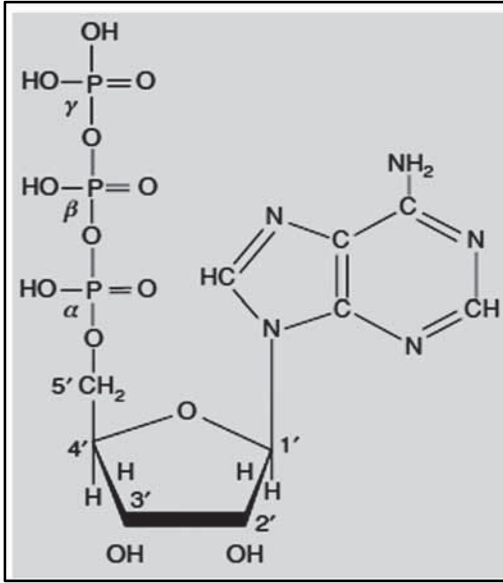


موضع التفاعل

الشكل 3.2: (أ) NAD^+ و $NADP^+$ (مؤكسد) (ب) NADH وNAPPH (مُختزَل). في NAD+ و NADH تكون الـــ R = H. في NADP+ وNADPH تكون الـــ $R = PO_3^2$

تستعمل الخلية النامية مصدراً للكربون، ولكنها تستعمل أيضاً عناصر ومواد أولية أخرى تدخل في تركيبة الخلية ونموها. نذكر على سبيل المثال النيتروجين والأكسجين اللذين تحصل عليهما الخلية الهوائية من الهواء (أما في الحالة الأخرى فلا بد من الحصول على الأكسجين من عملية إعادة الهيكلة والترتيب للجزيئيات المُستعمَلة في النمو، أو قد يكون من الماء نفسه)، ومن العناصر الضرورية الأخرى نذكر أيضاً البوتاسيوم K^+، والمغنيزيوم Mg^{2+}، والكبريت S (بشكل كبريتات SO_4^{2+})، والفوسفور P (بشكل فوسفات PO_4^{3-}

)، وذلك إضافة إلى عدد لا حصر له من الشوارد كالحديد Fe^{2+}، والزنك Zn^{2+}، والمنغنيز Mn^{2+}... إلخ. تظهر ديناميكية هذا النظام من التفاعلات في الشكل 2.2.



الشكل 4.2: أدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP). يعطي الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) الطاقة عند كسر الرابطة غاما (γ)، وتُستخدم الطاقة المتحررة في بناء آصرة أخرى في الجزيء قيد البنيان. ينقص من الأدينوسين ثنائي الفوسفات جزيء الفوسفات الأخير، و ينقص من الأدينوسين أحادي الفوسفات المجموعتان الأخيرتان

2.2.2 عملية الهدم والطاقة Catabolism and energy

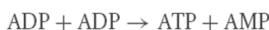
إن الصلة الأساسية بين عمليات الهدم (Catabolism) وعمليات البناء (Anabolism) تعتمد على كون عمليات الهدم تتولى إنتاج أنواع محدودة العدد من المواد والمركبات المتفاعلة (Reactive reagents) التي بدورها تُستعمل في توجيه وقيادة عملية البناء. ومن أهم تلك المواد والتي تُعتبر مفتاحاً لكثيرٍ من التفاعلات، نذكر الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (Adenosine Triphosphate) واختصاره (ATP) الذي يحتوي على روابط عالية الطاقة (High-energy bonds) بحسب تعبير علماء الأحياء، كما في الشكل (4.2). ويقع الرابط ذو الطاقة العالية في الــATP في البايروفوسفات (Pyrophosphate)، بين مجموعات الفوسفات، وهو عبارة عن رابط من نوع (Anhydride linkage) السريع التفكك عند وجود الماء، الذي يُحرر طاقةً عاليةً تُستعمل بشكل مباشر أو غير مباشر في إنشاء روابط جديدة في عمليات الأيض البنائي. يُعتبر جزيء الــATP المورّد الرئيسي للطاقة، أو باصطلاح آخر "العُملة

النقدية للطاقة" (Energy currency). وعندما يُستخدم الـــ ATP في عملية بناء حيوية (Biosynthetic reaction)، يتكسر بالتحليل المائي (Hydrolysis) إلى الـــADP، أدينوسين ثنائي الفوسفات (Adenosine diphosphate)، وأحياناً إلى AMP، أدينوسين أحادي الفوسفات (Adenosine monophosphate)، ويمكن تلخيص التفاعل بما يلي:



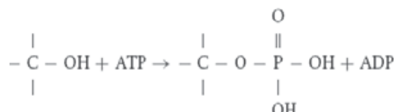
$$A + B + ATP \rightarrow AB + ADP + P_i \quad \text{or} \quad A + B + ATP \rightarrow AB + AMP + PP_i$$

حيث إن كلاً من A وB هي مركبات أيض كربونية في الخلية وPi هو فوسفات غير عضوي (Inorganic phosphate) والـــ PPi هو بايروفوسفات غير عضوي (Inorganic pyrophosphate). إن جزيء الـــADP لا يزال يمتلك رابطة عالية الطاقة يُمكن أن تُستعمل أيضاً لإنتاج الـــATP بواسطة أنزيم الفسفرة Adenylate kinase وذلك بتفاعل مبين في ما يلي:



$$ADP + ADP \rightarrow ATP + AMP$$

يتم تفاعل الفسفرة (Phosphorylation) لمركبات عديدة داخل الخلية وبشكل دائم، ويقتضي هذا التفاعل إضافة مجموعة الفوسفات لمركب ما بمساعدة جزيء الـــATP كما يبينه التفاعل التالي:



$$-\overset{|}{\underset{|}{C}}-OH + ATP \rightarrow -\overset{|}{\underset{|}{C}}-O-\overset{O}{\overset{\|}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}}-OH + ADP$$

في الكثير من الأحيان تزداد القدرة التفاعلية للجزيء بعد فسفرته مقارنة بالجزيء الأصلي.

3.2 مسارات الأيض الهدمي Catabolic pathways

1.3.2 معطيات عامة حول تكسير وهدم الكلوكوز

General considerations of glucose degradation

تهدف عملية تكسير المواد الأولية بشكل أساسي إلى إمداد الكائنات الحية المجهرية بما يلي:

- المونوميرات (Monomers) والجزيئات المختلفة لبناء الخلية الجديدة.

- الطاقة، عادة بشكل الــATP الذي بواسطته تُبنى روابط كيماوية في مركبات جديدة.
- طاقة مُختزِلة، وبشكل أساسي جزيئات الــ NAD و NADP التي يتم اختزالها إلى الــNADH و الــNADPH.

يعمل كل من الــATP والــNAD(P)H (ترمز إلى الــNADPH و NADH) على مساعدة أنزيمات مختلفة لتحويل مركبات متنوعة من بعضها إلى بعض.

تحتوي الكائنات الجرثومية على تشكيلة واسعة ضخمة من المركبات، ولكن بهدف التبسيط يمكن القول بأنها تتكون من:

- بروتينات تقوم بدور وظيفي (كالأنزيمات) أو وحدات بناء هيكلي كالبروتينات المتحدة مع الغلاف الخلوي أو مع عضيات أو هياكل داخل الخلية.
- الأحماض النووية (Nucleic acids)، كالــDNA والــRNA.
- الدهون (Lipids) وهي عبارة عن مركبات معقدة تحتوي في الغالب على الأحماض الشحمية (Fatty acids)، وهي تدخل في بناء أعضاء مختلفة وأغشية الخلية وعُضياتها أو أعضائها الصغيرة (Micro organ).
- سكريات معقدة (Polysaccharides)، حيث تدخل في تركيب الجدار الخلوي (Cell wall) وكبسولة الخلية (Cell-capsule).

كل هذه المواد يتم بناؤها من مواد بسيطة تعد سَلَفاً (Precursor) وهي كما يلي:

- البروتين من الأحماض الأمينية (Amino acids).
- الحمض النووي من قواعد نيوكليوتيدية Nucleotide bases (مع جزيء الريبوز "Ribose" والفوسفات).
- الدهون من الأحماض الشحمية (Fatty acids)، التي تكونت بدورها من جزيء الأسيتات (Acetate) والذي يحتوي على ذرتين من الكربون (C_2).
- السكريات المعقدة من السكر البسيط.

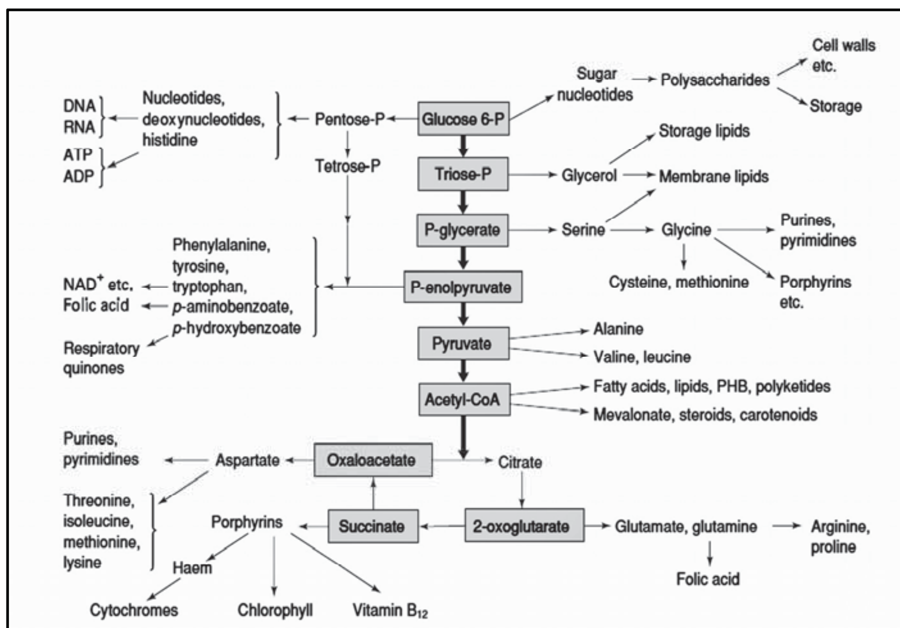
بناء على ما تقدم، فإننا نستطيع أن نُشخِّص قرابة تسع مواد أساسية تستخدمها الخلية في بناء كل ما تحتاج إليه من الجزيئات الضرورية لعملية التكاثر (انظر الشكل 5.2). بالتالي، طالما أن الخلية تستطيع إنتاج تلك المواد الأساسية التسع من أية مواد أولية (Substrate)، أو تشكيلة مواد أولية، فبإمكانها أن تعيد تصنيع نفسها (شريطة أن يتم إنتاج الــATP والــNAD(P)H بالتزامن مع إنتاج تلك المواد الأولية).

يُعتبر الكلوكوز مادة أولية لنمو خلية الكائن الحي المجهري. يتبين من دراسة عمليات تكسير الكلوكوز أنه يتحول إلى المواد التسع الأساسية (انظر الشكل 5.2) بطريقة مترابطة في مراحل تحليل الكلوكوز التي تسمى كلايكوليزس (Glycolysis)، والتي تسمى أيضاً (EMP) اختصاراً لــ (Embden-Meyerhof-Parnas) ، وقد تم توضيح المراحل والتفاصيل لهذه العملية في الشكل (6.2)، ثم استُكمل الإيضاح من خلال شرح تفاعلات أكسدة البايروفايت (Pyruvate) – الذي هو المُنتَج النهائي لعملية تحليل السكر – من خلال حلقة تفاعلات الحمض الكربوكسيليك الثلاثي Tricarboxylic acid cycle، (انظر الشكل 9.2).

بالإضافة إلى مراحل تحليل السكر (Glycolysis) المتعاقبة التي ذكرناها، هناك تفاعلات موازية لها بالأهمية وتقوم بإنتاج فوسفات السكر الخماسي أو بنتوز فوسفات (Pentose (C_5) Phosphates)، وفوسفات السكر الرباعي C_4 المسمى تيتروز فوسفات (Tetrose (C_4) Phosphate). تسمى مراحل فسفرة البنتوز هذه أحياناً بعملية "تحويلة البنتوز المفسفر" "(Pentose phosphate “shunt”)"، (انظر الشكل 7.2). إن الهدف من مراحل التفاعل هذه هو أولاً إنتاج مركبات رباعية وخماسية الكربون (C_4 و C_5) كوحدات بناء أساسية للبناء الحيوي Biosynthesis (انظر الشكل 5.2)، وثانياً، إنتاج طاقة مُختزلة NADPH أيضاً لنفس الغرض.

بالرغم من أن تفاعل EMP وتفاعل الفوسفات البنتوز (Pentose Phosphate - PP) يستخدمان الكلوكوز 6–فوسفات (Glucose 6-phosphaste)، فإن قرار الخلية باختيار مدى الأهمية والفعالية المعطاة لكلا المسارين تعتمد كلياً على الهدف الذي تريد الخلية الوصول إليه. ففي مراحل النمو الفعال السريع تستخدم الخلية

المسارين معاً وبنسبة فعالية 2 لــEMP مقابل 1 لــPP. وعندما تقِل سرعة النمو، فإن احتياج الخلية للبناء الحيوي يقل أيضاً، وبالتالي يتدنى الطلب على وحدات البناء، أي الــNADPH والــ C_5 ، والــ C_4. في هذه الحالة تُصبح الفعالية بنسبة 10 للــEMP مقابل 1 للــPP وقد تصل إلى 20 مقابل 1.



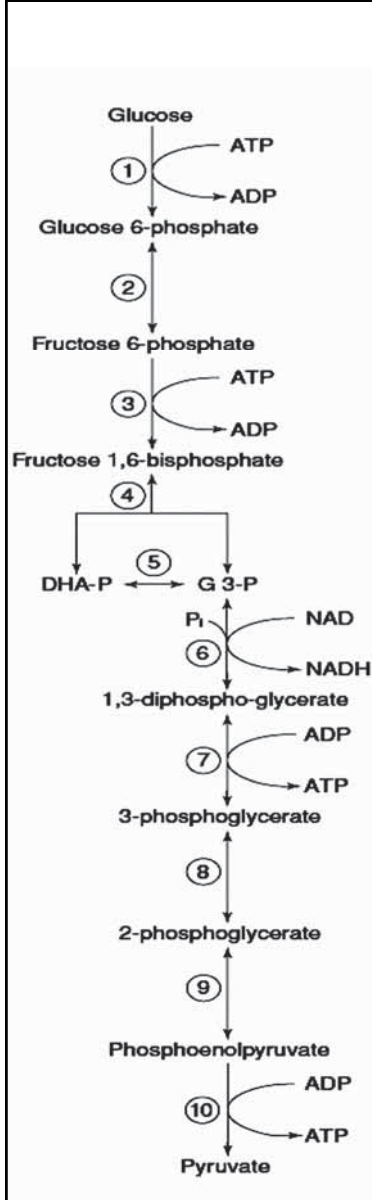
الشكل 5.2 : توضيح مسارات الأيض البنائي ومسارات الأيض الهدمي. تم تبسيط المسارات الرئيسية للبناء الحيوي فقط وأهم ارتباطاتها مع مسارات الهدم. لقد أُغفلت في هذا المخطط كل الارتباطات بين الجزيئات الخازنة للطاقة "ATP" والإختزال +NAD، +NADP، وكذلك أُغفِلت الصلة مع مسارات أيض النيتروجين..الخ. أما الــPHB الذي هو اختصار بولي هيدروكسي بيوتريت Poly-β-hydroxy butyrate، والــP الذي يمثل مجموعة الفوسفات. المواد الأولية الرئيسية التسع تظهر في المربعات المظلّلة.

ملاحظة: لتسهيل متابعة حركة الأيض ارتأينا وضع المتأيضات باللغة الانجليزية، علماً بأن التسمية العربية لمعظم هذه المواد ذكرت في متن هذا الكتاب (المترجمون)

نفهم مما تقدم أن عمليات الأيض مُنظَّمة ومُنضبطة بطريقة دقيقة جداً تتغير تبعاً لحاجات الخلية والتغيرات التي تمر بها (انظر التوسيع في الفقرة 8.2).

بالرغم من وجود مساريّ التفاعل EMP، والــPP في معظم الكائنات الحية، إلا أن بعض البكتيريا تمتلك مسار تفاعل بديلاً من الــEMP، ويسمى

(Entner-Doudoroff Pathway) (انظر الشكل 8.2)، الذي تعتمد عليه بكتيريا سودوموندس (Pseudomonads) وشبيهاتها. ولكن يبقى مسار الــPP فعّالاً في هذه البكتيريا، لأن مسار Entner-Doudoroff لا يُنتج مركبات فوسفات رباعية وخماسية الكربون (C_4 وC_5).



الشكل 6.2: عرض مسارات تحلل الكلوكوز عن طريق الــ (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP). التفاعل الإجمالي:



الكلوكوز$+2NAD^{+} + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2$ Pyrovate + 2NADH + 2ATP

تسريع وتحفيز التفاعلات بواسطة:

1) هيكسوكاينيز Hexokinase.

2) أنزيم إيزوميراز الكلوكوز 6–فوسفات (Glucose-6-phsphate isomerase).

3) أنزيم فوسفوفركتوميناز (Phosphofructokinase).

4) أنزيم ألدولاز Aldolase.

5) أنزيم إيزوميراز فوسفات الترايوز Triose phosphate isomerase.

6) أنزيم مزيل الهايدروجين عن كليسرالديهايد ثلاثي الفوسفات Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

7) أنزيم فسفرة الكليسيرايت 3–فوسفات -3 Phosphoglycerate kinase.

8) أنزيم فوسفو كليسيروميوتاير Phosphoglycero mutase.

9) أنزيم مزيل للماء من فوسفو اينول بايروفيت Phosphoenol pyruvate dehydratase.

10) أنزيم فسفرة البايروفايت Pyruvate kinase.

يرمز الــDHA-P إلى فوسفات الأسيتون الثنائي الهايدروكسين (Dihydroxyacetone phosphate) والــ G3-P إلى كليسرالديهايد 3–فوسفات (-Glyceraldehayde 3 phosphate). أما الــ Pi فهي فوسفات غير عضوي.

الكلوكوز

Glucose 6-phosphate كلوكوز – 6 – فوسفات

Fructose 6-phophate فركتوز – 6– فوسفات

Fructose 1،6 biphosphate فركتوز 1،6 – ثنائي الفوسفات.

– 1،3–diphpospho-glycerate 1-3 كليسيريت ثنائي الفوسفات

3–Phosphoglycerate 3 –فوسفو كليسيريت

2–phosphoglycerate 2–فوسفوكليسيريت

Phosphoenol pyruvate فوسفواينول بايروفيت

2.3.2 حلقة تفاعلات حمض الكربوكسيل الثلاثي

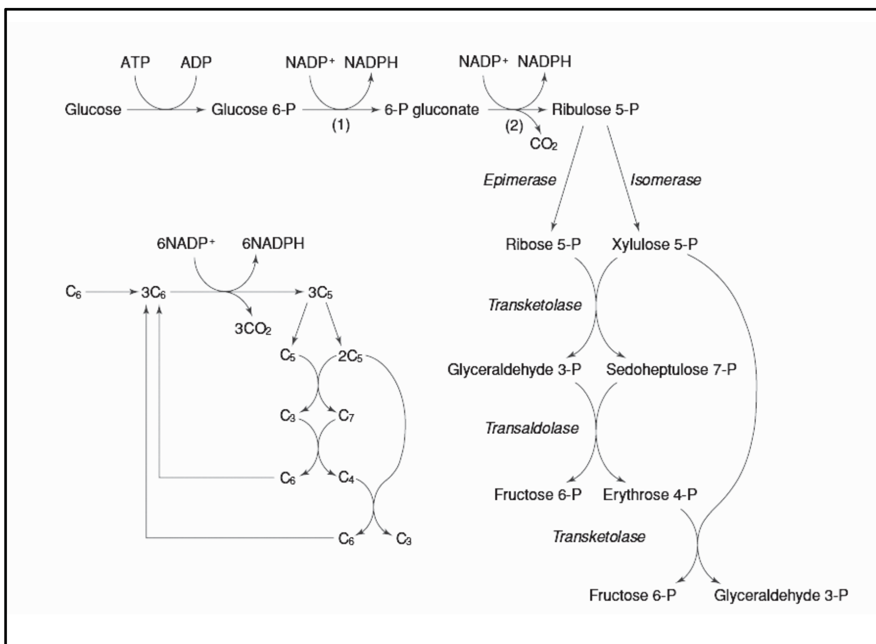
Tricarboxylic Acid Cycle

إن الهدف من تكسير سكر الكلوكوز، بغضّ النظر عن الطريقة أو المسار، هو الحصول على مركب حمض البايروفيك (Pyruvic acid) أو بايروڤيت، ذي الرمز الكيميائي $COOH-CO-CH_3$. ويختلف مصير أيض حمض البايروفيك بين كائن هوائي وآخر غير هوائي. ففي المسار الهوائي، يفقد البايروڤيت ثاني أكسيد الكربون ويتم تنشيطه كيميائياً من خلال تحويله إلى أستيل كو–أنزيم A (Acetyl Coenzyme A) وباختصار تسمى أستيل كوA (Acetyl – CoA) ، كما يدخل في هذا التفاعل جزيء الــNAD^+ كما يبين التفاعل المعقد التالي:

بايروڤيت + كو أنزيم A + NAD^+ ← أستيل كوأنزيم A + NADH + ثاني أكسيد الكربون

هذا التفاعل يُحفَّز بواسطة أنزيم البايروڤيت المزيل للهايدروجين Pyrovate dehaydrogenase، (أما مصير مادة البايروڤيت بالمسار اللاهوائي فسيتم توضيحه لاحقاً).

إن مركب الأستيل كوA هو عبارة عن ثايوإيستر (Thioester) وبالتالي فإنه يمتاز بقدرة عالية على التفاعل، منتجًا بذلك الكثير من أنواع مواد وسيطة (Intermediate)، ولكن المصير الأساسي وإن لم يكن الوحيد، هو عملية تأكسد تدريجي من خلال سلسلة حَلَقية متواصلة من التفاعلات تسمى حلقة حمض الستريك (Citric acid cycle) أو حلقة حمض الكربوكسيل الثلاثي (Tricarboxylic Acid Cycle) أو أيضاً حلقة "كريبس" Krebs cycle نسبة لاسم مكتشفها.



الشكل 7.2: حلقة تفاعلات فوسفات البنتوز (Pentose phosphate cycle)، وتسمى أيضاً تحويلة الهكسوز أحادي الفوسفات (Hexose monophosphate shunt)، الأنزيمات المشاركة بالتفاعل مرقمة كالتالي:

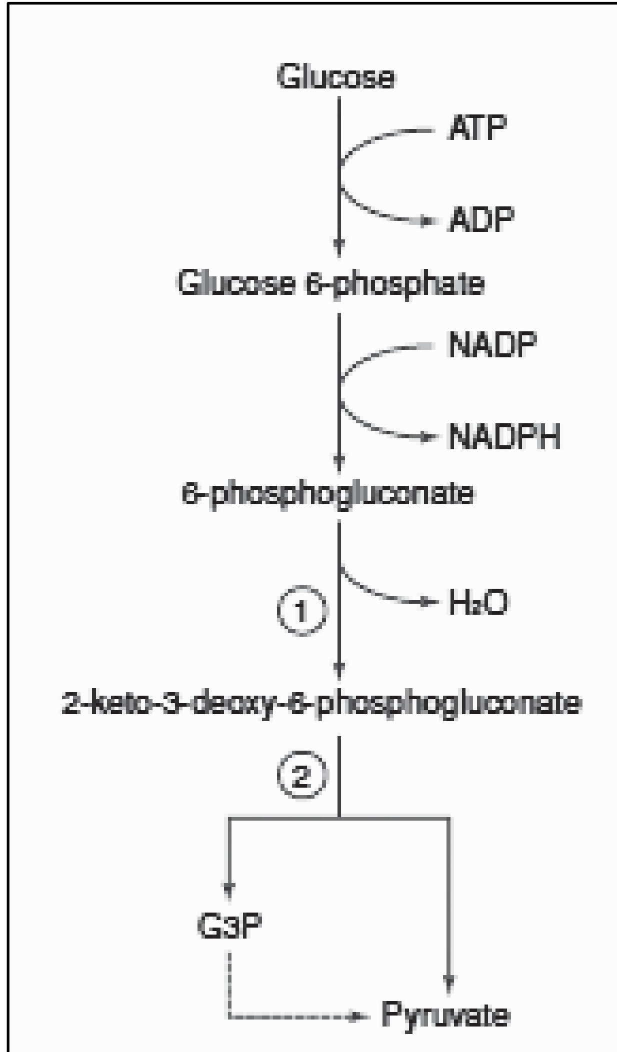
(1) أنزيم مُزيل للهيدروجين من كلوكوز 6–الفوسفات، (Glucose -6- phosphate dehydrogenase). 2) أنزيم مزيل الهيدروجين من فوسفوكلوكونيت (Phosphogluconate dehydrogenase).

يبين المخطط باختصار العلاقة بين المواد الداخلة في التفاعل والناتجة منه. يعاد استعمال 6– فوسفات الفركتوز Fructose 6-phosphate وتحويله إلى 6–فوسفات كلوكوز Glucose 6-phosphate بأنزيم الأيسومريز Isomerase. يمكن أيضاً إعادة تدوير واستعمال 3– فوسفات كليسرالديهايد بعملية تكسير السكر المعكوسة (Reverse glycolysis)، كما في الشكل 6.2 . بما أن إعادة التدوير كاملة فإن المسار يعمل كمُولِّد لإنتاج الــNADPH، علماً بأن تفاعلات الترانس ألدولايز Transaldolase وترانس كيتوليز Transketolase تسمح بتحوير السكر (من نوع أول لثاني ومن الثاني للأول interconversion) لاستخدامها بطرق أخرى. أما حصيلة التفاعل فهي كالآتي:



glucose + ATP + 6NADP^{+} → 3 phosphate glyceraldehyde +ADP + 6NADPH + 3CO2

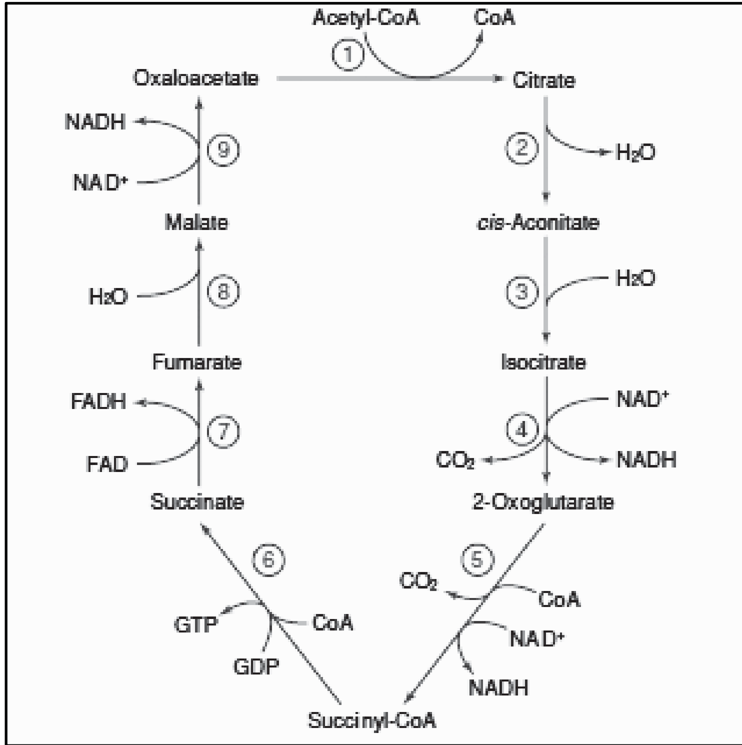
(إن أية إزالة للسكر C4 أو الــ C5 لعمليات البناء سوف يوقف استمرارية عملية إعادة التدوير Recycling، وعليه فالكمية المنتجة من الــ NADPH سوف تكون أقل).



الشكل 8.2 : خطوات التفاعل حسب مسار EDP (Entner-Doudoroff Pathway) والذي يقوم أحياناً بدل مسار EMP (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) في بعض أنواع بكتيريا سودوموناس (*Pseudomonads*) وشبيهاتها (أنظر الشكل 6.2).

الأرقام تمثل الأنزيمات التالية: 1) أنزيم مزيل الماء من فوسفوكلوكنيت، (Phosphogluconate dehydaratase). 2) أنزيم الدوليز محدد A specific aldolase.

يتحول كليسرالديهايد 3- فوسفات (Glyceraldehyde 3-phosphate) أو (G3P) إلى بايروفيت (Pyruvate) بواسطة الأنزيمات التي ذكرت في الشكل 6.2.



الشكل 9.2: حلقة تفاعلات حمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid cycle). ملاحظة: يمكن استبدال GTP/GDP في التفاعل رقم 7 بـــ ATP/ADP. مختصر التفاعل في كل الحلقة كما يلي:



Acetyl coA + 3NAD^{+} + FAD + GDP(ADP) → acetyl Co - A + 2CO$_2$ + 3NADH +FADH^{+} + GTP(ATP)

تقوم بتسريع التفاعلات الأنزيمات التالية بحسب ترقيم المراحل: (1) أنزيم تصنيع الستريت، (Citrate Synthase). (2) و(3) أكونِتيز، (Aconitase). (4) أنزيم مزيل هيدروجين من شبيه الستريت ، (Isocitrate dehydrogenase). (5) أنزيم مزيل هيدروجين من 2−اوكسوكلوكونيت ، (2-Oxogluconate dehydrogenase). (6) أنزيم فسفرة−كبريتية للسكسينيت، (Succinate thiokinase). (7) أنزيم مزيل هيدروجين من السكسينيت ، (Succinate dehydrogenase). (8) فيوماريز، (Fumarase). (9) أنزيم مزيل هيدروجين من الماليت، (Malate dehydrogenase).

إن تفاعلات حلقة حمض الستريك، (Citric acid cycle) الموضحة في الشكل (9.2)، تتولى إنجاز وظيفتين مهمتين:

- توفير مواد أولية وسيطة للبناء الحيوي (انظر الشكل 5.2)، ومن أهمها الـــ2 أوكسوكلوتريت (2-Oxoglutrate) المستعمل في إنتاج الكلوتمايت (Glutamate) الذي يشكل سلفا للكلوتامين (Glutamine) والأرجنين (Arginine)، والبرولين (Proline)، ومن أهم المركبات الوسيطة أيضاً نذكر السكسينيت (Succinate) فهو يُستعمل لصناعة البورفيرين (Porphyrins)، وأيضاً الأوكزالوأستيت (Oxaloacetate) المُستخدم في تصنيع الأسبارتيت (Aspartate) وعائلته من الأحماض الأمينية (انظر الفصل الرابع عشر).
- توفير طاقة تَنتج من الأكسدة الكاملة للأستيل كو A إلى كل من ثاني أكسيد الكربون وماء. انظر التفصيل في الفقرة (5.2).

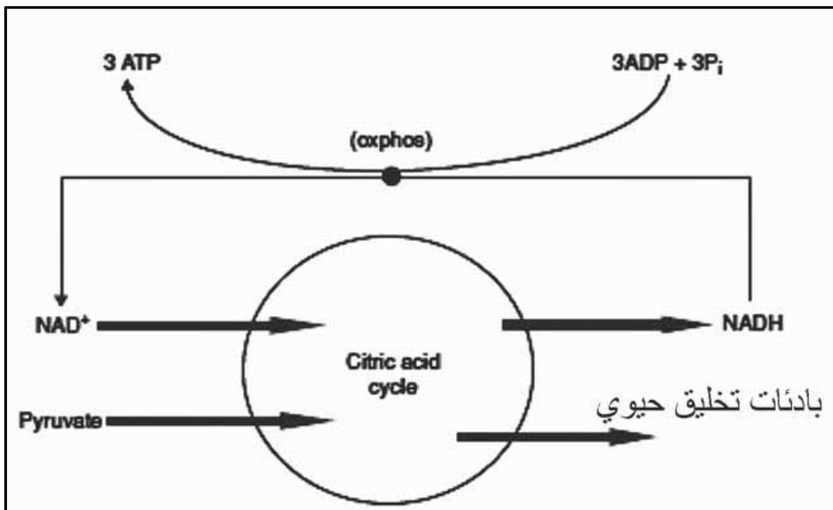
إن حلقة تفاعلات حمض الستريك لا تستطيع حصر نشاطها بالقيام بإحدى الوظيفتين بدون الأخرى. فإذا أزيلت المواد الأولية الوسيطة أثناء استعمالها في البناء الحيوي، فسيترتب على ذلك نقص في إنتاج الطاقة. في المقابل، إذا تمّت أكسدة كل الأستيل كو A إلى ثاني أكسيد الكربون وماء، حينها لن تبقى مواد أولية وسيطة كافية لعملية البناء الحيوي. لذلك فإن هذه الحلقة من التفاعلات توازن نفسها بين الهدفين. إن البايروفيت الناتج من تحليل الكلوكوز يُشكل المدخل المحرك لحلقة تفاعلات حمض الستريك التي تقوم بإنتاج الطاقة، كما تُصنِّع المواد الوسيطة الأولية للبناء الحيوي (انظر الشكل 10.2). وعندما تبلغ هذه الدورة هدفها التوأم تصبح غير قادرة على إعادة إنتاج أوكزالواستيت (Oxaloacetate) الضروري لعملية تصنيع الستريت (Citrate)، وذلك لأن جزءاً من المواد الأولية الوسيطة يتم استنفادها بعملية البناء الحيوي. وعليه يصبح من غير المجدي استمرار إنتاج الطاقة، وكذلك لأنه لا يوجد عملية بناء بدون مواد أولية. وهنا أصبح من الضروري أن يتم توفير أوكزالواستيت من خلال مسار آخر وهو:



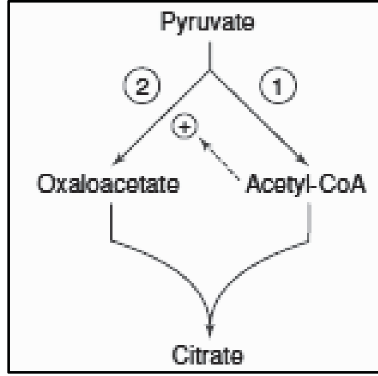
$$\text{pyruvate} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetyl-CoA} + CO_2 + \text{NADH}$$

ويتم هذا التفاعل بواسطة إضافة أنزيم الكربوكسيلاز (Pyruvate carboxylase). ولكن، بما أن الأوكزالواستيت هو ناتج من هذه الحلقة فإن عملية إدخال مجموعة كربوكسيل على البايروفيت لابد من تنظيمها أيضاً ليتمكن من

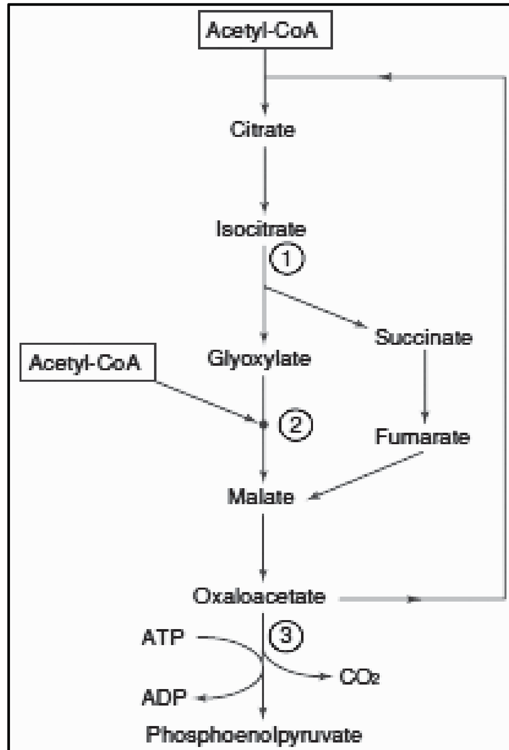
تأمين الأستيل كوA وأوكزالواستيت بكميات متساوية. ويتم ضبط هذه العملية من خلال أنزيم إضافة كربوكسيل للبايروڤيت والذي يعتمد على الاستيل كوأنزيم A كمُحَفِّز إيجابي (Positive effector) يزيد من فعاليته (انظر الفقرة 8.2). إن الاستيل كوA يقوم بالتحفيز بدون أن يدخل بالتفاعل. وكلما كان الاستيل كوA متوفراً كانت عملية إنتاج أوكزالواستيت أسرع. يتم استهلاك كل من الأوكزالواستيت والاستيل كوأنزيم A بنسب متساوية، وذلك لإنتاج الستريت (Citrate). ومع مرور الوقت يتناقص تركيز الاستيل كوA مما يؤدي إلى نقص في نشاط أنزيم الكربوكسيلاز للبايروڤيت، ولكن بما أن أنزيم إزالة هيدروجين من البايروڤيت بايروڤيت ديهيدروجيناز (Pyruvate dehydrogenase) لا يزال ناشطًا فسيُنتج أستيل كوA ما يعيد رفع التركيز. بهذه العملية تضمن الخلية استمرار إنتاج السيتريت، كما يُحفظ التوازن بين التفاعلين المسؤولين عن إنتاج المواد الأولية لتصنيع الستريت (انظر الشكل 11.2). يسمى هذا النوع من التفاعل الأنزيمي الذي يعني بإضافة كربوكسيل للبايروڤيت بالتفاعل الترميمي (Anaplerotic reaction) الذي يعني إعادة ملء أو تزويد (Replenishing).



الشكل 10.2: رسم يُظهر الدور الثنائي لحلقة تفاعلات حمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid cycle) لتوفير مواد أولية وسيطة وطاقة بشكل ATP. Oxphos ترمز لعملية الأكسدة والفسفرة.



الشكل 11.2: رسم يُظهر كيفية تأمين متساوي للأوكزالوأستيت (OAA) و أسيتيل كو أنزيم A (AcCoA) لتصنيع حمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid). يتم تحفيز نشاط أنزيم كربوكسيلاز للبايروفيت (2) Pyruvate carboxylase بواسطة أستيل كوانزايم A المُنتَج بواسطة أنزيم مزيل الهيدروجين من البايروفيت (1) (Pyruvate dehydrogenase).



الشكل 12.2: رسم بياني يُظهر تفاعل المسار كلايوكسليت البديل (Glyoxylate bypass). إضافة إلى تفاعلات حلقة حمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid cycle) المبينة في الشكل 10.2، هناك تفاعلات من (1) أنزيم مُحلِّل شبيه الستريت (Isocitrate lyase)،

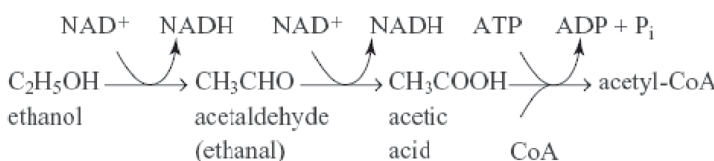
(2) أنزيم مُصنِّع ماليت (Malate Synthase). كما يُظهر الرسم أيضًا كيفية تصنيع السكر من مادة الاستيل كوأنزيم A باستعمال المسار البديل الجانبي الذي يقوم به أنزيم فسفرة 3 فوسفواينول بايروفيت كربوكسيل (carboxykinase phosphoenolpyruvate)، ويتلو ذلك عملية تحليل كلوكوز المعكوسة Reverse glycolysis كما في الشكل (14.2).

ملاحظة: يتم تفاعل هذا المسار البديل فقط في الأحياء المجهرية وخلايا النباتات (بالتحديد في البذور المتبرعمة عند استخدام ثلاثي أسيل كلسرول (Triacylglycerol) كمصدر وحيد للكربون، ولكنه لا يحصل في الخلايا الحيوانية.

3.3.2 مسار كلايوكسليت البديل (glyoxylate bypass) للنمو باستخدام مركبات ثنائية الكربون (C_2)

The glyoxylate by-pass for growth on C_2 compounds

لا يمكن لحلقة حمض ثلاثي الكربوكسيل أن تقوم باستقلاب كامل عند الأحياء المجهرية التي تنمو باستعمال مركبات ثنائية الكربون (C_2) أو باستعمال الأحماض الشحمية، أو الكربون المهدرج (Hydrocarbons)، أو أية مادة أخرى تتكسر لتعطي جزيئات ثنائية الكربون C_2 (انظر الفقرة 4.3.2). إن أستيل كوA يمكن أن يتحرر مباشرة من الأسيتيت عند استعماله كمصدر للكربون، وكذلك من أي مركب كربون C_2 قد يكون أكثر اختزالاً من الاسيتيت، كما هو الحال في الأسيتالديهايد (Acetaldehyde) أو الإيثانول (Ethanol)، كما هو مبين في سلسلة التفاعلات التالية:



فالطريقة التي تتحول فيها وحدة الأسيتيت إلى مركب كربوني رباعي C_4 تعرف بمسار كلايوكسليت البديل (Glyoxylate bypass)، (انظر الشكل 12.2) والذي يقتضي تدخُّل أنزيمين إضافيين إلى تلك المستعملة في دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل وهما أنزيما محلل شبيه السترايت (Isocitrate lyase)، وتصنيع الماليت (Maltase synthase). يقوم الأول بهدم شبيه السترايت (Isocitrate)

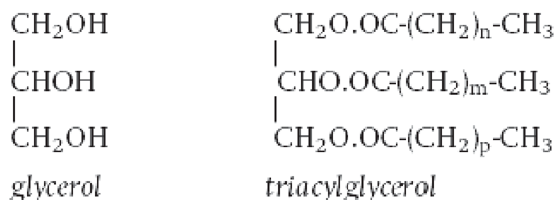
إلى كل من سكسينيت (Succinate) وكلايوكسيليت (Glyoxylate). والأنزيم الثاني يقوم بإضافة أسيتيل كو A للكلايوكسليت لإنتاج الماليت (Malate). لا يُنتَج هذان الأنزيمان إلا عند تلقي إشارة للقيام بذلك (انظر الفقرة 4.8.2)، التي تحصل عند نمو الكائن المجهري على مركبات ثنائية الكربون C_2 حيث تتضاعف فعالية هذين الأنزيمين من 20 إلى 50 مرة. إن المسار كاربوكسيليت البديل لا يحل محل حلقة تفاعلات حمض ثلاثي الكربوكسيل: مثال على ذلك الــ2–أوكسوكلوتريت (2-oxoglutarate) الذي يستمر إنتاجه من شبيه الستريت (Isocitrate) من أجل توفير كلوتمايت لعملية تصنيع البروتين... إلخ. والسكسينيت المنتج من نشاط أنزيم محلل شبيه الستريت، يتم إنتاجه واستعماله في عمليات الأيض كالمعتاد لإنتاج ماليت ثم أوكسالواستيت. بالنتيجة، ومن خلال حلقة تفاعلات الكلايوكسليت يتم الحصول على مركبات رباعية الكربون C_4 من مركبات C_2، التي تستخدم في عمليات الأيض الخلوي والنمو، (انظر الشكل 5.2). وسيتم إيضاح مراحل تحوّل مركبات رباعية الكربون C_4 إلى سكر بعملية نشوء سكر جديد تسمى عملية كلوكونيوجنيزس (Gluconeogenesis)، والمذكورة بالتفصيل في الفقرة 4.2.

4.3.2 مصادر كربون غير الكلوكوز Carbon sources other than glucose

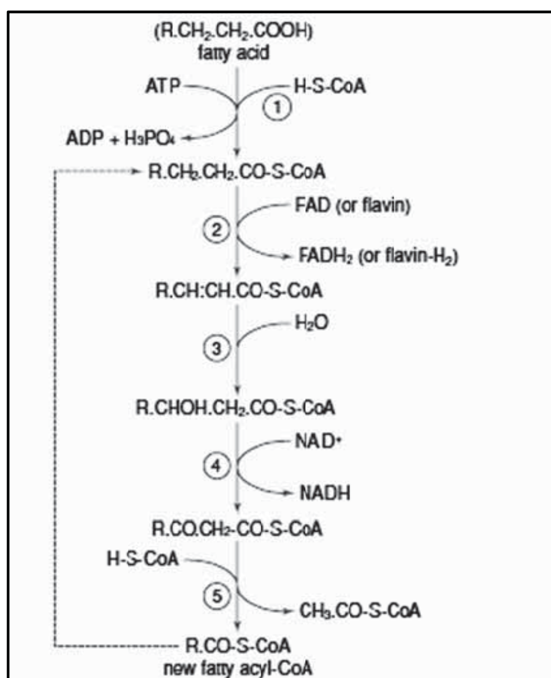
تستطيع الكائنات الحية التغذي على أيٍّ من المركبات الوسيطة (Intermediates) التي تُنتَج خلال تحليل الكلوكوز (Glycolysis)، أو التي تتكون خلال نشاط الأنزيمات المناسبة في حلقة حمض الستريك Citric acid) cycle). كما يمكن للكائنات الحية أن تستخدم مواد أولية أخرى عديدة كمصدر للكربون. فكل المواد الطبيعية (Natural compounds) قابلة للتحلل، وكثير من أنظمة التحليل تتواجد داخل منظومة الكائنات الحية المجهرية. لذلك تُعتبر الكائنات الحية المجهرية هي أنظمة لإزالة النفايات (Waste disposal units) وذات تطبيقات عديدة في مجال التقانة الحيوية البيئية، وسيتم تفصيلها في الفصل السابع عشر.

ولتوضيح هذا التنوع سنأخذ كمثال عملية هدم الأحماض الشحمية من قبل الكائنات الحية المجهرية، إذ إن الكثير من الكائنات المجهرية تستطيع أن تنمو على

الزيوت والشحوم. والفرق بين الزيت والشحم هو أن الأول سائل والثاني صلب في درجة حرارة الغرفة (20 درجة مئوية). أما من ناحية التركيب الكيميائي، فليس هناك فرق بينها إذ إنها عبارة عن شحوم كليسرول ثلاثي الإيستير (Fatty acyl triester glycerol) كما يبين الشكل التالي:



ترمز الــ n والــ m والــ p في الغالب إلى العدد 14 أو 16. قد تكون سلسلة أسيل (Alkyl chain) مشبعة (Saturated fatty acyl) أو غير مشبعة (Unsaturated fatty acyl) إذا اشتملت على رابطة مزدوجة واحدة على الأقل. أما إذا اشتملت على روابط مزدوجة متعددة فإنها تسمى Polyunsaturated.



الشكل 13.2: حلقة تفاعلات الأكسدة "بيتا" (β-oxidation) لمركّب ايستر اسيل كوأنزيم A الشحمي (Fatty acyl-CoA esters). الأنزيمات المسؤولة (1) أنزيم تصنيع أسيل كو A

(Fatty acyl-CoA Synthase). (2) أنزيم مؤكسِد أسيل كو A (Fatty acyl-CoA Oxidase) في الخمائر والفطريات ويكون مرتبطاً بالفلافين (Flavin)، أو أنزيم مزيل هيدروجين من أسيل كوA الشحمي (Fattyacyl-CoA dehydrogenase) في البكتريا يرتبط بـــ FAD. (3) أنزيم إضافة ماء على 3.2 انيول ــ كوA (2,3-enoyl-Co A hydratase) والمعروف أيضاً باسم كروتونيز (Crotonase). (4) أنزيم المزيل هيدروجين من 3−هايدروكسيل أسيل كوA (3-hydroxyacyl-Co A dehydrogenase). (5) أنزيم مُزيل "ثيول" من أوكزو أسيل كوA (3-Oxoacyl-CoA Thiolase). إن الجزيء الجديد من أسيل كوأنزيم A الشحمي يبدأ حلقة التفاعل مرة أخرى على مستوى التفاعل رقم (2).

يتم هدم وتحليل الزيوت المُستعملة في زراعة الأحياء المجهرية (Microbial cultures) بواسطة أنزيم لايبيز (Lipase) إلى مركباته الأصلية وهي أحماض شحمية وكليسرول، ثم يتحول هذا الأخير إلى 3−فوسفات كليسرالديهايد (Glyceraldehyde 3 phosphate) (انظر الشكل 6.2). أما الحمض الشحمي فيدخل الخلية مباشرة حيث يتحول إلى ثايواستر كو أنزيمA (Coenzyme A thioesters). يتحلل إيستر أسيل كوA الشحمي (Fatty acyl-CoA) بتفاعلات متتالية (انظر الشكل 13.2)، تؤدي إلى تقصير سلسلة الأسيل الشحمي وذلك بفقدان وحدة ثنائية الكربون C_2 وهي أسيتيل كو أنزيم A. يسمى هذا المسار بحلقة تفاعلات الأكسدة "بيتا" (β-oxidation). وذلك لأن عملية التحلل تبدأ بقطع رابطة بالموقع الثالث المصطلح على تسميته "بيتا" (β)، وفي كل دورة من التفاعل يُنقَص من سلسلة إيستر أسيل كوأنزيم A جزيئاً واحداً من الأسيتيل، وتتكرر التفاعلات الأربعة في كل دورة إلى أن نحصل على مركب أسيل شحمي رباعي الكربون يسمى بيوتريل كوأنزيم A (Butyryl-CoA)، وهذا الأخير يتكسر من خلال الدورة الأخيرة من أكسدة "بيتا" إلى جزيئين من أسيل كوA.

وبالنسبة إلى الأحماض الشحمية غير المشبعة (انظر الفصل السادس عشر)، لا بد من تعديل لموقع الرابطة المزدوجة كي يتناسب للتفاعل الذي يقوم به الأنزيم الثاني في الحلقة (Hydratase)، أي رقم (3) (انظر الشكل 13.2)، وهي عبارة عن عملية إضافة ماء.

إن عملية تمثيل وتكسير الأحماض الشحمية تُحرر طاقة بشكل حرارة وليست بشكل ATP الذي يستعمل في عمليات الأيض. ويتم ذلك من خلال إعادة أكسدة الــ $FADH_2$ (Reoxidation) (انظر الشكل 13.2) ودمجه بالأكسجين O_2، ذلك ما يُنتِج بروكسيد الهيدروجين H_2O_2. ثم يقوم أنزيم المسرع كاتاليز Catalase بتفكيك H_2O_2 إلى ماء H_2O ونصف جزيء أكسجين $1/2\ O_2$ مطلِقاً من خلال ذلك كمية كبيرة من الطاقة الحرارية. ولهذا فإن الكائنات الحية المجهرية التي تعيش على الأحماض الشحمية والمواد المشابهة مثل ألكاين ذات سلسله طويلة (Long chain alkanes) تُنتِج كمية هائلة من الطاقة الحرارية. وكما سيوضح الفصل الثالث، إن المواد الدهنية كالأحماض الشحمية وما يشابهها، تعتبر غنية بالطاقة مع فقر نسبي في الكربون، على العكس فإن المواد السكرية ذات طاقة قليلة وكربون عال نسبياً. وعليه ففي الحالة الأولى يتم تشغيل عملية الهدم للتخلص من فائض الطاقة بشكل حرارة، وذلك بأقل خسارة ممكنة من الكربون. بينما يُفَضَّل هدم السكريات عند الحاجة إلى الاحتفاظ بالطاقة والتخلص من فائض الكربون بشكل ثاني أكسيد الكربون CO_2.

4.2 عملية نشوء الكلوكوز من جديد Gluconeogenesis

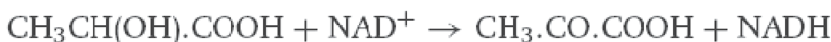
عندما تنمو الكائنات الحية على مركّب ثنائي أو ثلاثي الكربون (C_2 أو C_3) أو أي مادة أولية أخرى تُعطي بعد استقلابها تلك المركبات، أو تُعطي مواد أيض وسيطة (Metabolic intermediates) تسبق خطوة إنتاج البايروڤيت (مثلاً أسيتيت، إيثانول، لاكتيت Lactate أو الأحماض الشحمية). فمن الضروري لهذه الكائنات أن تصنع أنواعاً مختلفةً من السكر لإتمام متطلبات عمليات الأيض، وتسمى هذه العملية نشوء واستحداث سكر جديد (Gluconeogenesis) (انظر الشكل 14.2). بالرغم من أن معظم تفاعلات مسار تحلل السكريات (Glycolysis) (انظر الشكل 5.2 و6.2) هي تفاعلات قابلة للانعكاس (Reversible)، إلا أن أنزيم فسفرة البايروڤيت (Pyruvate kinase) وأنزيم فسفرة فسفات الفركتوز (Phospho fructokinase)، لا يستطيعان القيام بتفاعل منعكس، وعليه فلا بد للخلية من إيجاد البديل.

بما أنه لا يمكن إنتاج مركب الفوسفواينول بايروڤيت إنطلاقاً من البايروڤيت (إلا في حالات قليلة)، فإن الأوكزالواستيت تُستعمل كمادة أولية سابقة، كما في التفاعل التالي:



Oxaloacetate + ATP → Phosphoenolpyravate + ADP + CO_2

إن الأنزيم المساعد لهذا التفاعل هو أنزيم فسفرة كربوكسيل الفوسفواينول بايروڤيت (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) والذي هو أساس عملية نشوء السكر الجديد. لقد سبق شرح عملية تكوين أوكزالواستيت مسبقاً ضمن تمثيل الاستيت في الفقرة 3.3.2)، أما بما يتعلق باعتماد النمو على الحمض اللبني (Lactate) أو البايروڤيت نفسه، فإن الحمض اللبني يتحلل إلى بايروڤيت بعملية أكسدة كما يلي:



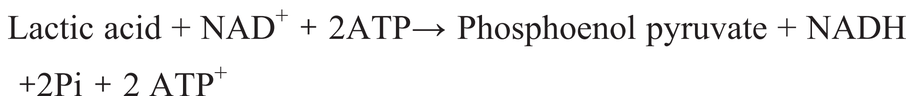
$$CH_3CH(OH).COOH + NAD^+ \rightarrow CH_3.CO.COOH + NADH$$

ثم يتحول البيروفايت إلى أوكزالواسيتيت بمساعدة أنزيم كاربوكسيلاز إلى البيروفايت، كما يبين التفاعل التالي:



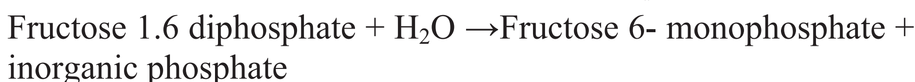
$$CH_3.CO.COOH + CO_2 + ATP \rightarrow COOH.CH_2.CO.COOH + ADP + P_i$$

ثم يتم تحويل أوكزالواسيتيت إلى فوسفواينول بايروڤيت كما هومبين أعلاه.
ويكون مجمل التفاعل في حالة النمو على حمض اللبن كما يلي:

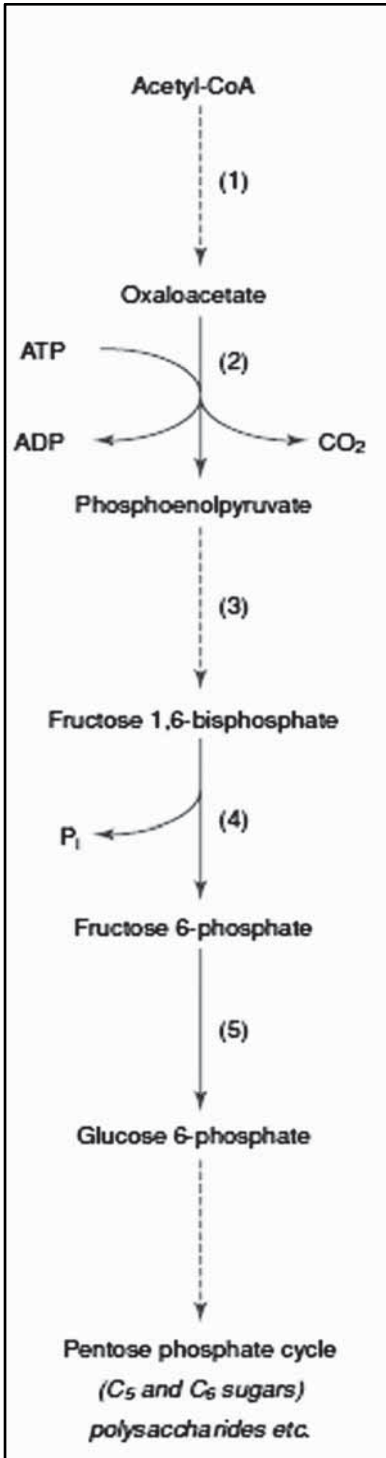


Lactic acid + NAD^+ + 2ATP→ Phosphoenol pyruvate + NADH +2Pi + 2 ATP^+

أما بالنسبة إلى عدم قدرة الأنزيم الثاني في مسار تحليل السكر (Glycolysis) على التفاعل المنعكس، أي أنزيم فسفرة فوسفات الفركتوز (Phospho fructokinase) الذي يُنتِج فركتوز الثنائي الفوسفات بالموقع 1 و6 (Fructose 1.6-bisphosphate)، فإنه بإمكان حل المشكلة من خلال نشاط أنزيم ازالة الفوسفات من الفركتوز ثنائي الفوسفات (Fructose 1.6-bisphosphate) كما في التفاعل:



Fructose 1.6 diphosphate + H_2O →Fructose 6- monophosphate + inorganic phosphate



الشكل 14.2: تسلسل عملية نشوء سكر جديد (Gluconeogenesis sequence) . إنطلاقاً من مادة أولية كالأستيل كوA يتم تحويله (1) بواسطة مسار الكلايوكسيليت البديل " Glyoxylate bypass" (انظر الشكل 12.2) إلى أوكزالواسيتيت (Oxaloacetate) ثم إلى فوسفواينول بايروفيت (Phosphoenol pyruvate)، بواسطة (2) أنزيم فسفرة كربوكسي الفوسفواينول بايروفيت (Phosphoenol pyruvate carboxykinase). ثم يتحول إلى فركتوز 1،6 ثنائي الفوسفات (Fructose 1،6-biphosphate)، (انظر الشكل 6.2) عن طريق (3) أنزيمات متتابعة في تحلل السكر (glycolysis) القادرة على التفاعل المنعكس (Reversed glycolytic sequence of enzymes)، ويتحلل هذا الأخير بوجود الماء (Hydrolysed) لينتج فوسفات غير عضوي (Inorganic phosphate = Pi) وذلك بمساعدة أنزيم (4) ازالة الفوسفات من الفركتوز ثنائي الفوسفات (Fructose 1،6–biphosphatase). ثم يقوم أنزيم ايزوميرايز (5) بتغيير شكل الفركتوز أحادي الفوسفات ليتحول إلى كلوكوز 6–فوسفات (Glucose 6-phosphate). يقوم كلوكوز 6– فوسفات بتغذية مسار فسفات السكر الخماسي كما في الشكل (7.2) (Pentose phosphate pathway)، كما يمكن للخلية استعماله كي تصنع كبسولتها المكونة من سكريات متعددة (Polysaccharides).

ومن هذه النقطة يتبين لنا أنه يمكن إنتاج السكر السداسي الهكسوس (Hexose) بواسطة العملية العكسية لتحليل السكر(Reverse glycolysis)، بينما يتم تصنيع السكريات الرباعية والخماسية (C_4 و C_5) عن طريق مسار فوسفات السكر الخماسي، كما في الشكل (7.2). لا يُعتبر الكلوكوز نفسه الناتج النهائي لعملية نشوء السكر الجديد، ولكن فوسفات الكلوكوز (Glucose -6-phosphate)، الذي يُستعمل في تصنيع مركبات الجدار الخلوي المتنوعة، وكذلك يُستعمل لإنتاج مواد كثيرة ضرورية تُفرز خارج الخلية أو يتم تخزينها في الداخل كالسكريات المعقدة (الفصل السادس عشر).

5.2 توليد الطاقة في الكائنات المجهرية الهوائية

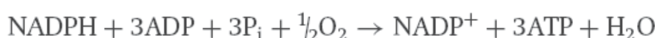
Energy production in aerobic microorganisms

لقد أوضحنا سابقاً كيفية استقلاب الكلوكوز (الشكلان 6.2 و 7.2)، وحلقة تفاعلات الحمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid cycle) (الشكل 9.2) ، وأكسدة نواتج أيض وسيطة أولية التي تتزامن مع اختزال عدد محدود من العوامل المساعدة (Co-factors) مثلا NAD^+، $NADP^+$، والــFAD لإنتاج الأشكال المختزلة منها وهي بالتتابع NADH، NADPH و $FADH_2$. ثم يتم الحصول على طاقة الاختزال لهذه المركبات، في الكائنات الهوائية، عبر مجموعة تفاعلات معقدة تؤدي بالنهاية إلى اختزال للأكسجين الجوي بحيث يصبح ماء. ويطلق على هذه التفاعلات الفسفرة المؤكسدة (Oxidative phosphorylation) أما النواقل (Carriers) التي تسمى "سلسلة نقل الإلكترون" (Electron transport chain) فإنها تقوم بالتفاعلات المتتابعة لنقل الإلكترونات وشوارد الهيدروجين أي البروتون (Hydrogen ions - proton) ليتم اتحادها مع الأكسجين O_2 ليشكل الماء. وتدعى وظيفة نقل الإلكترون المرفقة بالفسفرة اختصاراً ETP أي (Electron transport-coupled phosphorylation) ويكون الهدف الأساس لتلك العملية هو تصنيع الــATP، والعملية بمجملها هي عبارة عن عملية تنفس خلوي. تشكل "سلسلة نقل الإلكترون" مع الأنزيم المُنتِج للــATP (ATP synthase) نظاماً متكاملاً ومتعدد

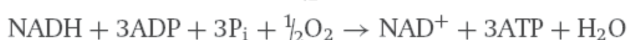
المكونات، يكون موضعه في الغشاء السيتوبلازمي الخلوي عند البكتيريا، أما في الخلايا ذات النواة الحقيقية (Eukaryotes) فإن موضعه في غلاف السبحيات أو الميتوكوندريا (Mitochondrial membrane).

خلال الخطوات المتتابعة لنقل الإلكترون في سلسلة نقل الإلكترون يتم صُنع الــATP من المادة الأولية ADP والفوسفات غير العضوي (P_i) في نقطتين من السلسلة، وفي الأغلب ثلاثة بحسب طبيعة المادة المُختزِلة كما يبين الشكل 15.2. إن مبدأ وعملية تصنيع الــATP هو نفسه في مختلف الكائنات، بالرغم من بعض الاختلاف في سلسلة نقل الإلكترون (تسمى أيضاً سلسلة التنفس Respiratory chain) بين البكتيريا وتلك الموجودة في السبحيات (الميتوكوندريا) كما في الشكل 15.3، حيث تمّت مقارنة العملية نفسها عند السبحيات وعند بكتيريا أشريشيا كولاي (*Escherichia coli*). إن معمل تصنيع الــATP والمسمى ATP synthase هو بروتين مركب، ذو موضع عرضي في الغشاء بحيث يجتازه من جهة إلى أخرى، وتتواجد الجزيئات المختزِلة على جهة من الغشاء، بينما يتواجد بروتون الهيدروجين H^+ على الجهة الأخرى (الشكل 16.2). فعندما تبدأ المواد المختزِلة بالارتباط بسلسلة نقل الإلكترون فإن المزيد من البروتونات المتحررة تخرج من خلال الغشاء لتتراكم على الجهة المعاكسة (لتواجد الطاقة المختزِلة)، وتعمل البروتونات المتراكمة على تفعيل الــATP synthase من خلال تحفيز دورانها ضمن الموقع، ما يؤدي إلى عملية دمج الــADP مع الفوسفور اللاعضوي (Pi) لتشكيل جزيء من الــATP. وتسمى هذه الطاقة قوة البروتون للتفعيل Proton motive force = PMF. من الواضح أن هيكل الغشاء وموقع سلسلة نقل الإلكترون والــATP synthase لها التأثير الكبير بربط كل أطراف التفاعل ببعضها البعض، ومن دون ذلك لن يكون هناك قوة البروتون ولا سلسلة نقل الإلكترون، وبالنتيجة لن يكون تحرر للطاقة.

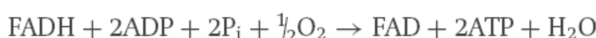
بالنسبة إلى حالات جزيئات الاختزال الثلاثة المذكورة يمكن تلخيص التفاعلات بما يلي:



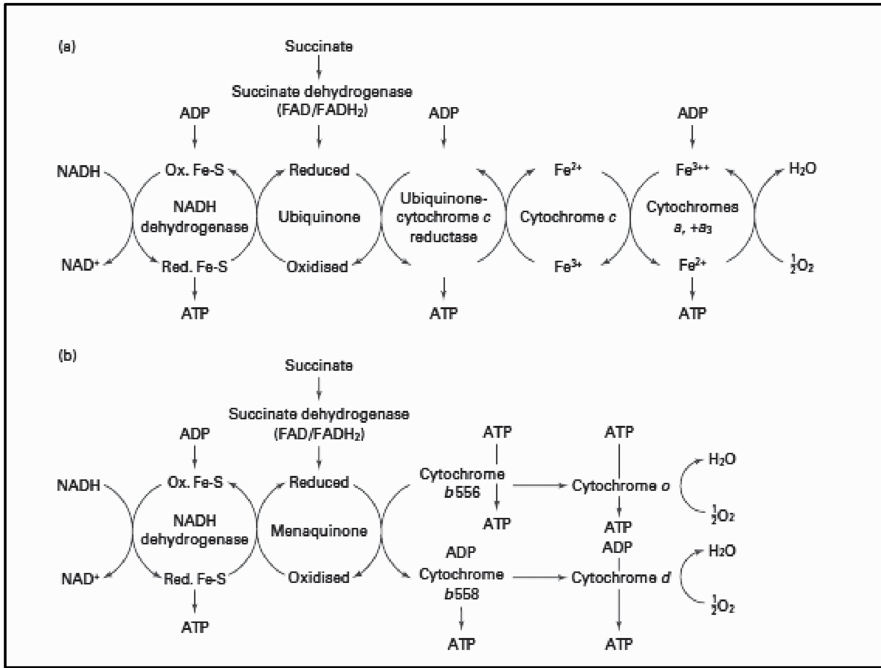
$$NADPH + 3ADP + 3P_i + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow NADP^+ + 3ATP + H_2O$$



$$NADH + 3ADP + 3P_i + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + 3ATP + H_2O$$



$$FADH + 2ADP + 2P_i + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow FAD + 2ATP + H_2O$$



الشكل 15.2: نظام انتقال الإلكترون المرافق للفسفرة (Electron transport–coupled phosphorylation System(ETP)) (أ) في السبحيات أي مايتوكوندريا و(ب) في بكتيريا اشريشيا كولاي *E.coli*. لم يتم رسم كل المركبات الحاملة للإلكترون Electron carriers حيث إن حوالى ستة عشر بروتيناً يتدخلون في العملية في كل من الحالتين. هناك فروق مهمة بين حاملات الإلكترون في كلتا الحالتين، في بكتيريا كولاي تنقسم سلسلة التفاعلات إلى فرعين ويتم نقل الإلكترون والبروتون في الاثنين معاً، كما هو ظاهر في التفاعل.

إن المواضع المبينة في الرسم لعملية فسفرة الــADP لتكوين الــATP هي غير دقيقة إذ إن عملية الفسفرة تلك تحصل في الأنزيم المركب ATP synthase المعقد وموقع هذا المركب غير مبين في هذا المخطط ولا حركته الفيزيائية في الغشاء والمسؤولة عن الفسفرة (انظر الشكل 16.2).

وعليه فمحصول الــATP المتحرر من تلك العملية بالتفاعلات الثلاثة المذكورة هو بالتسلسل 3، 3 و 2. يُطلقُ أحياناً على نتاج الــATP نسبة الــ P/O (P/O ratio) والتي تعني كمية الــATP المُنتَجة من عملية اختزال نصف جزيء أكسجين ½ O_2 وتحويله إلى ماء H_2O ويترتب على ذلك نقل إلكترونين.

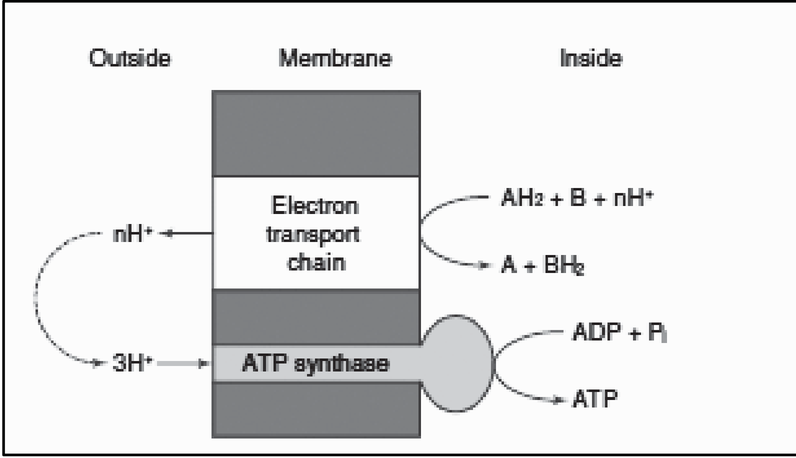
يُلخِّص الجدول 1.2 كمية الــATP المحرَّرة من مول واحد من السكر عند استقلابه بمسار الــEMP (الشكل 6.2) واستقلاب البايروفيت الناتج من ذلك

من خلال تفاعلات حلقة حمض الكربوكسيل الثلاثي (الشكل 9.2). كما يبدو جلياً في الجدول، فإن معظم كمية الــATP المحرر تكون من خلال عملية انتقال الإلكترون واقترانها بتفاعلات حلقة حمض الستريك (Citric acid cycle).

الجدول 1.2: منتوج الــATP من عملية استقلاب الكلوكوز

	عدد مول (mole) من الــATP المُنتَج من مول واحد من السكر السداسي (hexose)
تحليل السكر (كلوكوز إلى بايروفيت):	
الإنتاج الصافي للــATP = 2 مول	2 (أ)
NADH = 2 مول x 3	6
بايروفيت إلى أستيل كوA:	
NADH = 1 مول x 3 (x 2 بما أن هناك 2 بايروفيت)	6
دورة حمض الكربوكسيل الثلاثي:	
NADH = 3 مول x 3 (x 2 بما أن هناك 2 أستيل كوA)	18
$FADH_2$ = 1 مول x 2 (x 2 بما أن هناك 2 أستيل كوA)	4
ATP = 1 مول (x 2 بما أن هناك 2 أستيل كوA)	2 (ب)
العدد الكلي	38

(أ) في الظروف اللاهوائية تُعتبر هذه الكمية الحد الأقصى الذي يمكن الحصول عليه وهي 2 مول انظر الفقرة (1.6.2). (ب) يتم إنتاجه من الــGTP، انظر الشكل (9.2)، بواسطة أنزيم فسفرة نيوكليوتايد ثنائي الفوسفات (Nucleotide diphosphate kinase)



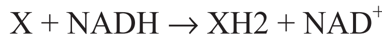
الشكل 16.2: عملية الاقتران في الــETP. تقع حاملات وناقلات الإلكترون Electron transport carriers ضمن الأغشية (أنظر الشكل 15.2). عندما تتم أكسدة المواد المُختزِلة (Reductant) والمرمز لها بــ AH2 يتم تحريك البروتون عبر الغشاء نحو الجهة المعاكسة لمكان وجود المواد المُختزِلة. ثم تعبر هذه البروتونات الغشاء مرة أخرى كي تقود بذلك الــ ATP synthase إلى عملية تصنيع الــATP وذلك باتحاد الــADP مع الفوسفور غير العضوي Pi.

6.2 الأيض اللاهوائي Anaerobic metabolism

1.6.2 مفاهيم عامة General concepts

في ظروف لاهوائية لا تحصل عملية الفسفرة المؤَكسِدة (Oxidative phosphorylation)، وبالتالي لا يمكن للخلية أن تحرر الطاقة بهذه الطريقة التي تُعد الطريقة الرئيسية. في هذه الظروف يجب تأمين إنتاج الطاقة من عملية تحليل المواد الأولية الأساسية. هذه عملية للحصول على الطاقة بالطريقة اللاهوائية تسمى "الفسفرة على مستوى المواد الأولية" (Substrate level phosphorylation)، وتُنتِج فقط 15% من طاقة المواد الأولية مقارنة بالطريقة الهوائية. (انظر الجدولين 1.2 و 2.2)، لذلك يجب أن تستهلك الخلية مواد أولية أكثر لبناء وزن معين من الخلايا، وذلك مقارنةً بما تستخدمه بالنظام الهوائي. ويصح القول أيضاً إنه باستعمال وزن محدد من السكر بواسطة النظام اللاهوائي، فإن الخلية ستبني عدداً أقل من الخلايا مقارنة باستعمال نفس وزن السكر بالطريقة الهوائية.

في الظروف الهوائية تحاول الخلية إنتاج الطاقة بأعلى فعالية ممكنة، وإن الطاقة المختزِلة الناتجة من تكسر المواد الأولية، لابد من إعادة استخدامها من أجل استمرارية التفاعل، إذ إن كميتها محدودة في الخلية. وعليه فلا بد من إقران أكسدة المواد المختزِلة مع عملية اختزال لبعض المواد الكربون الوسيطة التي تتراكم نتيجة لذلك. ويلخص التفاعل بما يلي:



$$X + NADH \rightarrow XH2 + NAD^{+}$$

الجدول 2.2: تفاعلات الفسفرة على مستوى المواد الأولية (Substrate-level phosphorylation) في ظروف لاهوائية

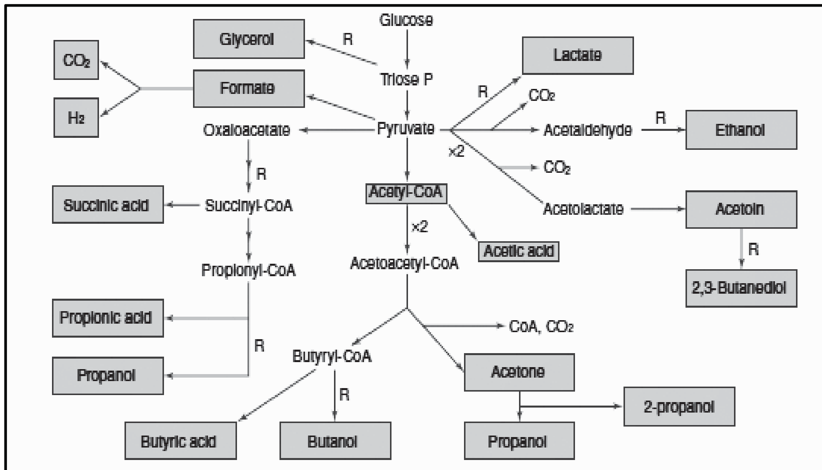
الأنزيم	التفاعل المُسرَّع	التواجد والانتشار
1 – أنزيم فسفرة فوسفوكلسيرول (Phosphoglycerol kinase)	3.1 بسفوسفوكليسريت + ADP ← 3– فوسفوكليسريت + ATP	واسع الانتشار انظر شكل 6.2
2 – أنزيم فسفرة بايروفيت (Pyruvate kinase)	فوسفواينول بايروفيت + ADP ← بايروفيت + ATP	واسع الانتشار انظر شكل 6.2
3 – أنزيم فسفرة أسيتايت (Acetate kinase)	استيل فوسفات + ADP ← استيت + ATP	واسع الانتشار
4 – أنزيم فسفرة بيوتيريت (Butyrate kinase)	بيوتريل فوسفات + ADP ←بيوتيرات + ATP	في البكتيريا Enterobacteria عندما تتغذى على Allantoin
5 – كاربامايت كاينيز (Carbamate kinase)	كاربوميل فوسفات + ADP ← كاربامايت + ATP	في بكتيريا الـــ Clostridia عندما تتغذى على الـــ Arginine
6 – أنزيم تصنيع فورميل تتراهايدروفوليت (Formyl- tetrahydrofolate synthase)	ADP + N^{10}-formyl-H-Formate ← P_i + folate H_4folate + ATP +	بكتيريا Clostridia تتغذى على مادة Xanthine

إن جزءاً قليلاً فقط من الطاقة المُختزِلة يتم استعمالها بذاتها لبناء خلايا جديدة. لذلك فإن جزيئات الاختزال تتفاعل مع مواد كربون أولية وسيطة (Carbon Intermediates)، وذلك لاختزالهم أيضاً كما في الشكل (1.2 – ب). وعليه فإن مصدر الطاقة الوحيد المتوفر للخلية يبقى الـــATP المتكون خلال عملية الهدم والتكسير اللاهوائية للمواد الأولية. يبين الجدول (2.2) أمثلة على عملية الفسفرة على مستوى المادة الأولية (substrate-level phosphorylation) والتي تتباين لجهة كمية الطاقة المُحررة بين الكائنات المختلفة، وكذلك تختلف بحسب المادة الأولية المستعملة كغذاء، كما تختلف أيضاً إذا ما كان الأسيتيت يتراكم كمنتج نهائي للتفاعل، والذي يبدأ إنتاجه بوجود أنزيم فسفرة الأسيتيل (Acetyl kinase) فعال (انظر الجدول 2.2).

إن عملية الهدم بالطريقة اللاهوائية لا تحصل في الأحياء المجهرية فحسب، وإنما أيضاً في الحيوانات الراقية. فمثلاً يتجمع الحمض اللبني (Lactic acid) في عضلات الرياضيين خلال مرحلة الجهد العالي في الأداء الرياضي. وفي الأحياء المجهرية، هناك أنواع كثيرة من المركبات الكربونية المختزَلة التي تتراكم داخل الكائن النامي بشكل لاهوائي، منها الحمض اللبني (في البكتيريا اللبنية)، والأحماض الشحمية ذات السلسلة القصيرة كحمض البيوترك (Butyric) والبروبيونك (Propionic)، كما تُنتج الكحول مثل بروبانول Propanol والإيثانول Ethanol (انظر الشكل 17.2). بعض الكائنات المولِّدة للميثان (Methanogenic bacteria)، والتي تذهب أبعد من ذلك وتنتج مواد كاملة الاختزال كالميثان كمنتج نهائي لهذه العملية (غير مبين في الشكل 17.2).

من المهم الإشارة إلى أن بايروفيت المُنتَج من طرق تحليل السكر (Glycolysis) كما في الشكل 6.2، سوف يستمر بالتفاعل، ولو جزئياً، عبر دخوله حلقة حمض الكربوكسيل الثلاثي، وذلك لتوفير المواد الأولية السابقة الرئيسية التي تُستعمل في عملية التمثيل الحيوي والتصنيع، وبشكل رئيسي الـــ2–أوكزوكلوتريت 2-oxoglutarate والأوكزالو أستيت (Oxaloacetate)، ولكن الهدف الأساس لهذا الاستمرار ليس إنتاج الطاقة، إذ إن الـــNADH الناتج من تفاعلات هذه الحلقة لن

يتحول إلى ATP طالما أن الخلية لا تحصل على الأكسجين اللازم لتفاعل الأكسدة والفسفرة؛ ولكن بعض أنواع البكتيريا لديها مادة غير الأكسجين تستقبل الإلكترون في نظام الــETP (المذكور في الشكل 15.2)، هذا ما يسمح بإنتاج الــATP. كمثال على تلك الكائنات الحية نذكر تلك القادرة على استخدام النايترات (Nitrate) عوضاً عن الأكسيجين، التي يتم اختزالها إلى نايترايت (Nitrite) بعد أن تستقبل الإلكترون، ثم تُختزَل بعد ذلك إلى أمونيا (NH_4) في بعض الأحياء، وأحياناً إلى نايتروجين (N_2) في عملية تسمى طرد النايتروجين (Denitrification)، (انظر أيضاً الفصل السابع عشر)، ونذكر أيضاً مثال البكتيريا القادرة على اختزال ثاني أكسيد الكربون إلى ميثان بعملية (الميثنة) (Methanogens)، هناك أيضاً اختزال السلفات (Sulphate) إلى كبريتيد الهيدروجين H_2S بواسطة البكتيريا المختزلة للسلفات (Sulphate reducing bacteria) كبديل للأكسجين. في كل الأحوال، ورغم أن كمية الحاصلة من الــATP أقل بكثير من تلك المُنتَجة بالطريقة الهوائية، يبقى الإنتاج أعلى مما لو استُخلص بطريقة الفسفرة على مستوى المادة الأولية (Substrate-level phosphorylation) لوحدها.



الشكل 17.2: نواتج الاستقلاب اللاهوائي في كائنات حية مختلفة. يشار بــR للتفاعل الذي يؤدي إلى إعادة استعمال الــ NADH. يمكن للمركبات النهائية داخل الإطارات المُظللة أن تُنتَج إفرادياً أو بمجموعات حسب نوع الكائن الحي. يصحب عملية تحول سكسينيل كوA (Succinyl-coA) إلى حمض سكسينيك (Succinic acid)، والبيوتيريل كوA (Butyryl-CoA) إلى حمض بيوتيريك (Butyric acid)، والأستيل كوA إلى حمض الخل (Acetic acid) إنتاج جزيء الطاقة ATP.

2.6.2 نواتج الإستقلاب اللاهوائي Products of anaerobic metabolism

يبين الشكل 17.2 ملخصاً للتفاعلات الرئيسية المُنتِجة لمركبات مختزَلة في الكائنات المجهرية اللاهوائية. نذكر من النواتج الرئيسية التالية:

- كليسرول، (Glycerol)، يُنتج بواسطة الخمائر عند توقف عملية تحول بايروفيت إلى إيثانول.
- حمض اللبني (Lactic acid)، يحصل داخل البكتيريا اللبنية Lactic acid bacteria.
- حمض النمل (Formic acid)، يُصنع من قِبل البكتيريا الداخلية (Enterobacteria)، وذلك بمساعدة أنزيم بايروفيت فورميت الياز (Pyruvate-formate lyase). والفورميت يمكن أن يتحول إلى ثاني أكسيد الكربون وهيدروجين بمساعدة أنزيم مزيل الهيدروجين من الفورميت (Formate dehydrogenase).
- إيثانول، (Ethanol)، تصنعه الخمائر المسماة ساكارومايسس سرفيسيي، *(Saccharomyces cerevisiae)*، والبكتيريا مثل زايمومونس *(Zymomonas)* وبعض أنواع الفطريات.
- 3,2 بوتانيدول (2،3 butanediol)، يُصنع من قبل بكتيريا مختلفة ومنها سيراشيا مارسيسنس *(Serratia marcescens)* وأيضاً أنواع أخرى من العصيات *(Bacillus)*.
- بيوتانول (Butanol) مع أسيتون (Acetone) وبعض البروبانول (Propanol) أو 2– بروبانول (2-Propanol)، من قبل باكتيريا كلوستريديا *(Clostredium spp.)*، وبعضها ينتج حمض بوتيريك (Butyric acid).
- حمض بروبيونيك (Propanoic acid)، المُنتج من قبل بكتيريا بروبيوني (Propionibacterium).

هناك مركبات أخرى قد تنتج من الأيض اللاهوائي لمواد غير الكلوكوز كالأحماض العضوية (Organic acids) مثل حمض الستريك والأحماض الأمينية، وحتى البيورين (purine).

إن الميثان (غير مبين في الشكل 17.2) هو مركَّب كربون نهائي ذو أقصى درجة من الاختزال، تقوم بإنتاجه بكتيريا عالية التخصص تسمى أركيا (Archaea) وهي البكتيريا التي كانت تعرف باسم (*Archaeabacteria*)، وتقوم بهذا الإنتاج من خلال انشطار الاسيتيت إلى ثاني أكسيد كربون وميثان (CO_2 + CH_4)، أو أيضاً من اختزال ثاني أكسيد الكربون CO_2، أو الميثانول (CH_3OH)، أو الايثانول (CH_3CH_2OH))، أو حمض النمل (HCOOH)، وكل تلك العمليات بوجود الهيدروجين H_2.

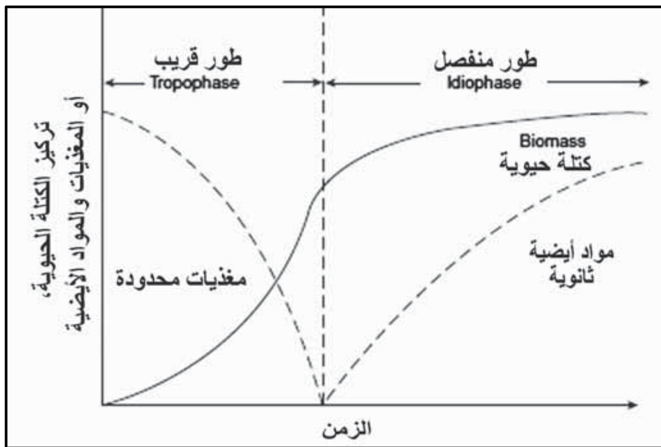
7.2 البناء أو التمثيل الحيوي Biosynthesis

إن مؤونة الخلية من الطاقة (ATP) وقدرة الاختزال (NADH والـ NADPH)، كما العديد من وحدات البناء الأولية السالفة (انظر الشكل 5.2) الناتجة من عملية تكسير المواد الأولية، كلها مجتمعة توفر للخلية مستلزمات نموها وانقسامها. حيث تأخذ الخلية وحدات البناء الأولية السالفة (Precursor) التي تشكل اللبنات الأساسية للبناء الحيوي للجزيئات الكبيرة (Macromolecules) كالحمض النووي (DNA و RNA) والبروتين (لبناء الأنزيمات والوظائف المختلفة)، والشحوم للأغشية، والسكريات المعقدة التي تدخل بتركيب الغلاف الخلوي (Cell envelope). تم شرح كثير من عمليات البناء الحيوي ومساراتها في فصول عدة من هذا الكتاب (انظر الفصول الرابع عشر، الخامس عشر والثامن عشر) ولا حاجة إلى تكرار سردها في هذا السياق. ولكن هناك نقطة نريد لفت الانتباه إليها وهي أن هناك فرقاً مهماً بين عمليات الأيض الأولية (Primary metabolism) وعمليات الأيض الثانوية (Secondary metabolism) والتي تلعب دوراً مهماً خلال إنتاج مركبات بالتقانة الحيوية.

1.7.2 عمليات الأيض الأولي (Primary metabolism)

تُعتبر عمليات الإستقلاب التي تحصل خلال مرحلة النمو المتوازن للكائن الحي "عمليات أيض أولي"، وتسمى أيضاً مرحلة التغيُّر (Tropophase)، التي يتوفر خلالها فائض من الغذاء في الوسط المحيط (الشكل 18.2). في هكذا ظروف تقوم الخلية بنمو يتسارع بشكل أسِّي (Exponential) ملتزمة بنمطها في التكاثر. في هذه الحالة يكون مستوى المركبات المختلفة والجزيئات الكبيرة (بروتين، دهون، DNA، RNA) في أعلى مستوياته. ولكن النسب بين تلك المركبات تتغير مع تقدم النمو الذي سيتباطأ مع الوقت.

ولكن في نهاية المطاف، لا بد من حصول نقص في المواد الغذائية، أو في عنصر الأكسيجين ببساطة، ويترتب على ذلك تباطؤ في عملية النمو، ثم التوقف الكامل. بالرغم من توقف النمو، فإن الاستقلاب يستمر، إذ إن توقف الأيض كلياً لا يكون إلا عند موت الخلية. لذلك فإن الخلية تستمر بالقيام بعمليات أيض طالما هي حية، والعكس صحيح بل أكثر أهمية، فإذا أرادت الخلية التشبث بالحياة لا بد لها من القيام بالحد الأدنى الضروري من الاستقلاب.



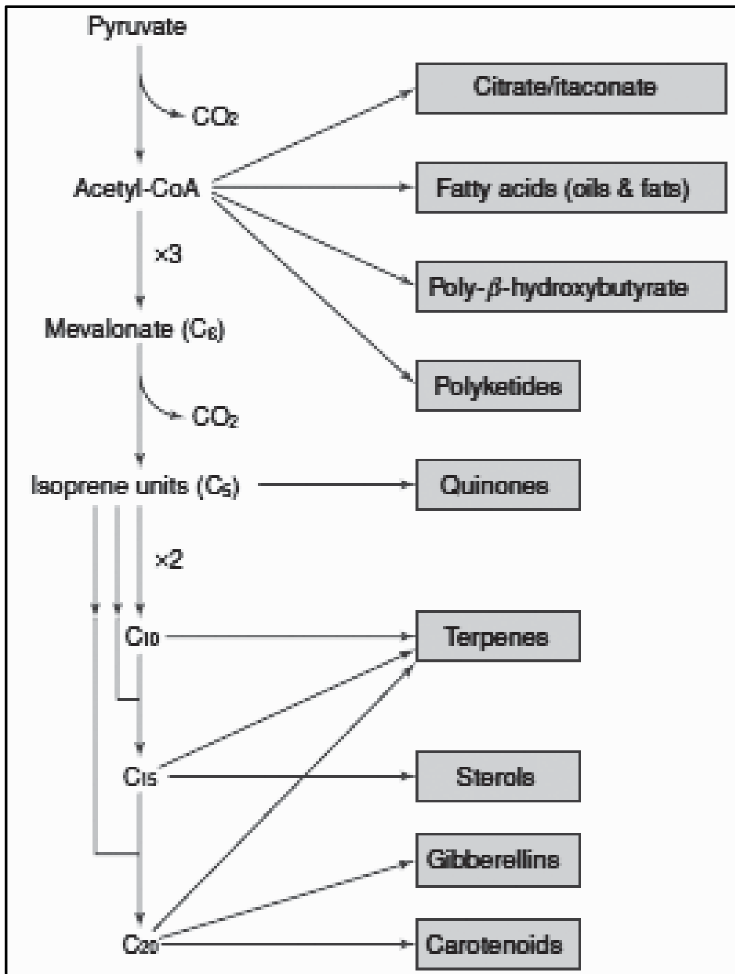
الشكل 18.2: النمو الجرثومي. مراحل الأيض الأولي والثانوي. في أول مراحل الأيض، عندما يكون النمو متوازناً (Balanced growth) = التروبوفيس Tropophase، تكون كل المواد الغذائية متوفرة بشكل فائض. وعند استهلاك أحد هذه المواد المغذية (غير الكربون) فإن نمو الخلية (المُعبّر عنه بالخط المتواصل ــ) يتناقص وعندها يبدأ الأيض الثانوي بالعمل مُنتِجاً مواد أيض ثانوية (secondary metabolites) في مرحلة نمو خاص تسمى Idiophase تتميز بالسكون وعدم التكاثر.

إن احتياج الخلية لاستمرارية تدفق الكربون من خلالها بعد توقفها عن الانقسام والتكاثر، يقتضي أن يتوجه مسار عمليات الأيض إلى إنتاج مركبات غير تلك المركبات الأساسية للتكاثر والتي تتناقص الحاجة إليها نظراً إلى توقف التكاثر. ولكن لابد من استمرار صيانة المركبات الأساسية لبقاء الخلية، ومنها البروتينات الأساسية والتي تَتبَع دورة انقلاب (Turnover) ولا بد من إنتاجها من جديد، كما لا بد أيضاً من أن يتم تصليح الخلل الطارئ للــDNA، كما يجب المحافظة على إنتاج الــ RNA واستمراريته ... إلخ. ويعني ذلك أن عمليات الأيض الأولي لا بد أن تستمر، ويترافق ذلك مع تحول من الأيض الأولي إلى الأيض الثانوي (انظر الشكل 18.2). نتيجة لذلك تظهر المواد الناتجة من الأيض الثانوي التي يمكن أن تُخزَّن في الخلية (بشكل سكريات معقدة أو كليسرول ثلاثي الأسيل (Triacylglycerol) (انظر الفصل السادس عشر)، ويمكن أيضاً أن تكون مواد أيض أولية (Primary metabolites) كالأحماض الأمينية والأحماض العضوية (انظر الفصلان الرابع عشر والخامس عشر)، كما يمكن أحياناً أن تُنتَج مركبات جديدة لا تتواجد عادة بكميات ملموسة في فترة النمو المتوازن (مُركبات فعالة كالمضادات المضادات الحيوية ــ انظر الفصل الثامن عشر). وهذه المركبات ذات أهمية كبرى في التقانة الحيوية.

بما أن منتجات الأيض الثانوي تختلف بين أنواع الكائنات الحية، فقد سُمِّيت مرحلة النمو غير المتوازن مرحلة الخمول أو الهدوء (Idiophase)، التي تتناقض مع مرحلة النمو المتوازن. يتم تصنيع نواتج الأيض الثانوية من المواد غير المرغوب بها، التي لازالت تُستخرج من عملية هدم الكلوكوز والأحماض الشحمية. وليس من المستغرب أن يُشكِّل أسيتيل كوA منطلقاً للتفاعلات التي تُنتج مركبات الأيض الثانوية (انظر الشكل 19.2).

إن وظيفة مركبات الأيض الثانوية غير معروفة بشكل مؤكد. وبما أنها لا تُنتَج خلال مرحلة النمو المتوازن، فهي إذاً غير ضرورية للنمو والتكاثر. وبما أن المركبات الثانوية تختلف كمّاً ونوعاً، فمن المتوقع أيضاً تنوع أدوارها ووظائفها.

هناك رأيان أو مدرستان حيال هذه الشأن، الأول يعتبر أن النواتج الثانوية تؤدي دوراً ضرورياً لحياة الخلية في البيئة الطبيعية، أو أنها تعتبر استجابة من الخلية لحاجة ما، تصعب مقاربتها وتقليدها ودراستها بالطرق المخبرية. أما المدرسة الثانية فإنها تَعتبر أن المركبات الثانوية بذاتها لا تشكل أية قيمة بالنسبة إلى الخلية المُنتِجة، ولكن مسار التفاعلات المؤدي إلى تلك المركبات يشكل أهمية معينة بالنسبة إلى الخلية. بغض النظر عن السبب والفائدة من تلك النواتج، فإن مركبات الأيض الثانوية تعتبر أهم ما يمكن استغلاله للتقانة الحيوية في كل زمان.



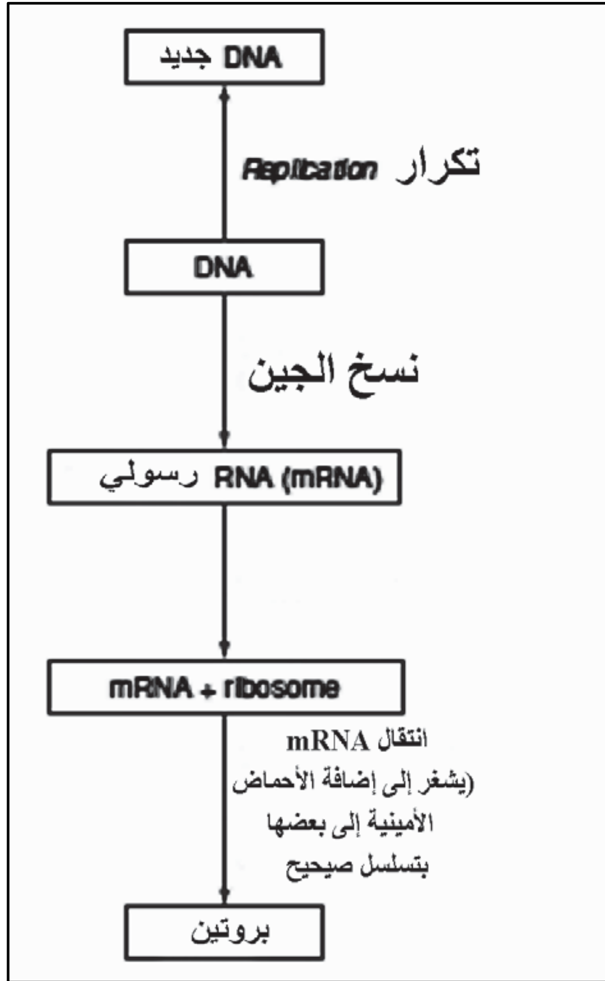
الشكل 19.2: توليد مُنتجات الأيض الثانوية من مادة أسيتيل كوA، وهي مرتبة داخل الأطر المظللة. هناك إمكانية اختلاف كبير في تركيب بعض هذه النواتج.

8.2 تنظيم وضبط عمليات الأيض Control of metabolic processes

1.8.2 تدفق الأيض Metabolic flux

تم تطوير مفهوم "تدفق الأيض" ضمن محاولة وضع طريقة حسابية لقياس سرعة الأيض (Rate) ولقياس نسبة تدفق مركبات الأيض الوسيطة في مختلف مسارات التفاعل. وبما أن تفاعلات الأيض بأي اتجاه كانت، تتم بمساعدة أنزيمات خاصة، فإن عمليه قياس فعالية كل أنزيم على حدة، ومع شيء من حسن الحظ، قد يُمكِّن من تحديد هوية أنزيم معين يقوم بتحديد سرعة كل التفاعلات التالية (Rate-limiting step) أو ما يمكن تسميته بالمرحلة المُبطئة للتفاعل. بعد تحديد هوية ذلك الأنزيم، يصبح ممكناً التحكم في سرعة تفاعلات كل مسار الأيض ازدياداً أو نقصاناً، إذ يُمكن لعلماء الوراثة تضخيم (Amplification) المورث المسؤول عن إنتاج ذلك الأنزيم لزيادة فعاليته، وبالتالي تسريع المسار، كما يمكن تثبيط نشاط ذلك الأنزيم بوسائل شتى لتوقيف المسار (انظر الشكل 20.2 والفصلان الرابع والخامس).

فمن خلال إزالة العامل المُحِد من سرعة التفاعلات (Rate-limiting step) يُفتح العنان لإنتاج المركب المطلوب بكمية غير محدودة. ولكن الأمور لا تكون بهذه السهولة، إذ إن الأنزيمات المتتالية التي تُسرِّع تفاعلات متتابعة تعمل بشكل متناسب، وعند إزالة العامل المُبطئ للتفاعل الإجمالي في المسار، يبدأ عندها الأنزيم التالي (في المسار نفسه) بالقيام بدور المُبطئ (Rate-limiting step). وعليه فإن أردنا إطلاق العنان لتفاعلات مسار معين بهدف إنتاج أعلى، فلا بد من هندسة جينية شاملة لكل الأنزيمات المسؤولة عن كل تفاعلات المسار. نذكر كمثال على ذلك إزالة معوقات أو خانقات الأيض التي تسمى (Metabolic bottle neck) التي سترد في فصول عديدة قادمة: إنتاج وفير من الأحماض العضوية (الفصل الرابع عشر) وإنتاج المضادات الحيوية (الفصل الثامن عشر).



الشكل 20.2: مخطط مثالي يبين أن الـــDNA يمكن أن يتضاعف (Replicated) ليعطي DNA جديد (لبناء الخلية الجديدة)، كما يمكن أن يُنسخ إلى الـــRNA الرسول (mRNA) والذي تُحلُّ شفرته أو يُترجَم (Decoded or translated) بواسطة الرايبوسوم إلى بروتين، وذلك بإضافة متسلسلة للأحماض الأمينية. فإن التسلسل الأصلي للقواعد في سلسلة الـــ DNA (أي المورث) يحدد إنتاج تسلسل القواعد في الـــRNA الرسول (mRNA) التي بدورها تتولى نشوء جزيء جديد من البروتين (انظر أيضاً الفصل الرابع والشكل 1.4)

لرفع مستوى إنتاج أي مُركّب لا بد من تحديد هوية الأنزيمات التي تلعب الدور الأساس في عملية تدفق الكربون الذي يُشكِّل مصدراً لمختلف المركبات

المُنتَجَة. ويمكن ضبط وتنظيم تدفق الكربون بأشكال مختلفة مبيَّنة باختصار في المقاطع التالية. هنا لا بد من ذكر طريقة تحسين مستوى الإنتاج من خلال إحداث طفرات جينية عشوائية في الكائنات المجهرية، ثم اختيار (من بين الأعداد الهائلة للخلايا المزروعة) واحدة أو اثنتين من الخلايا تُظهر قدرة عالية على إنتاج مُركَّب ما. ولكن بعد تقدُّم المعرفة بالجينات وطريقة تحويرها والكيمياء الحيوية، أصبح بالإمكان إجراء التغيير المطلوب بشكل دقيق لأنزيم محدد، أو مجموعة من الأنزيمات، من دون استعمال الطفرات العشوائية التي تعتمد على الاحتمال والمصادفة فقط. يقتضي ذلك بالطبع تحديداً عالي الدقة لهوية الأنزيم المسرِّع لتفاعل ما والمُراد تحويره، حتى لا تذهب جهود التحوير الهائلة سدى. إن دراسة وفهم كيفية عمل وضبط نشاط أنزيم معين هي من أهم اعتبارات التقانة الحيوية.

2.8.2 امتصاص وأخذ المواد الغذائية Nutrient uptake

يعتمد تنظيم عمليات الأيض في الخلية أولاً على ضبط امتصاص المواد المغذية. ومعظم تلك المواد الغذائية (ماعدا الأكسجين وقلَّة من مركبات الكربون) تدخل إلى الخلية بطرق نقل متخصصة بحيث تسمح بتراكم تركيز عال لتلك المواد داخل الخلية، بالرغم من تركيزها الخفيف في الخارج. ويُعرف هذا النوع من النقل بنظام النقل الفعال (Active transport system) الذي يستهلك الطاقة. يتم ضبط هذه العملية بشكل دقيق بحيث يتوقف نظام النقل الفعال عن العمل حال الحصول على التركيز المطلوب من تلك المواد المغذية، وذلك لتفادي التركيز الفائض غير المفيد، أو ربما الضار (سيناقش هذا الموضوع أيضاً في القسم 5.8.2 ضمن موضوع التثبيط بالمركب الناتج من عمليات الهدم أو catabolite repression). في بعض الحالات تكون سرعة امتصاص مصدر الكربون في الخلية، كالكلوكوز مثلاً، عاملاً مبطئاً لسرعة عملية النمو الخلوي بمجملها، لذا لا بد من الانتباه إلى ذلك عند دراسة المركبات الخانقة لعمليات الأيض (ضمن السعي إلى زيادة قدرة إنتاج مادة حيوية ما).

3.8.2 التوزيع إلى حجرات مستقلة Compartmentalization

هناك شكل مبسط لتنظيم الاستقلاب وذلك من خلال وجود حجيرات أو عضيات (Organelles) في داخل الخلية، حيث تجري داخل كل منها مجموعة تفاعلات منفصلة، وتحتوي كل منها على مجموعة منفصلة من المركبات. وأوضح مثال على ذلك هو حجيرة السبحية أو المايتوكوندريون (Mitochondrion) في الخلية ذات النواة الحقيقية، والتي يتم فيها فصل حلقة تفاعلات حمض الكربوكسيل الثلاثي عن باقي التفاعلات في السيتوبلازم (Cytoplasm). والمثال الآخر هو تصنيع الأحماض الشحمية الذي يتم في السايتويلازم، بينما يتم هدم الأحماض الشحمية (انظر الشكل 13.2) في حجيرات اسمها بيروكسيسوم (Peroxisome)، هذه الحجيرات، وكما يبدو من اسمها، غنية بأنزيمات شديدة الفعالية تُسمى بيروكسيدايز/ كاتاليز (Peroxidase/Catalase) التي تعمل في عمليات هدم مختلفة. إن الفصل بين مواقع مساري التصنيع والهدم يضمن عدم حصول أي تشابك واستعمال غير مجد للمواد الوسيطة المشتركة القابلة للتبادل وإعادة الاستعمال. هناك حجيرات أخرى كالفجوات Vacuoles، والنواة ... إلخ، التي تُستخدم لضبط وتنظيم تفاعلات أخرى. أما البكتيريا فلا بد لها أن تعتمد على طرق ووسائل أخرى في عملية تنظيم عمليات الأيض، وذلك لعدم وجود حجيرات، إذ إن الخلية هي عبارة عن حجرة واحدة.

4.8.2 تنظيم وضبط عملية تصنيع الأنزيمات

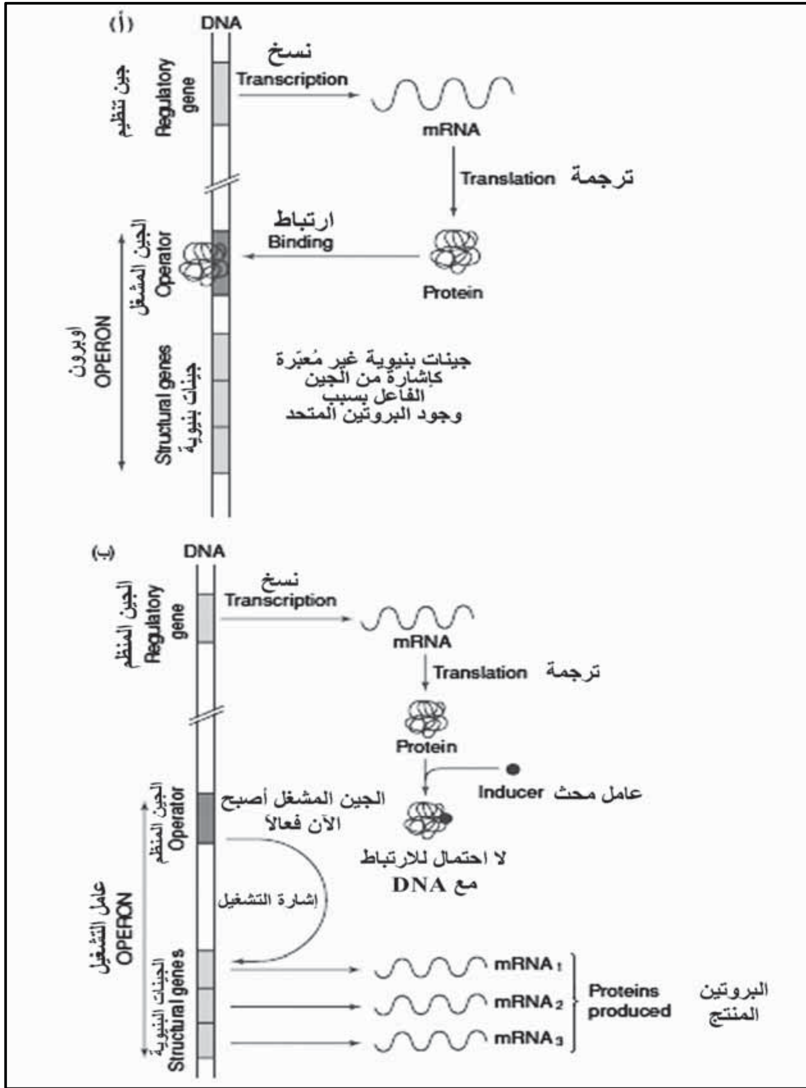
Control of enzyme synthesis

يتم تصنيع أنواع كثيرة من الأنزيمات داخل الخلية بشكل مستمر ومستقر، أي أنها متوفرة في مُختَلَف ظروف النمو. هناك أنزيمات أخرى لا تظهر أو تُصنَّع إلا عند الحاجة، مثال على ذلك أنزيم تحليل شبيه السترات (Isocitrate lyase) الذي يعمل في مسار الكلايكوسيليت البديل (الشكل 12.2) عندما تنمو الخلية على

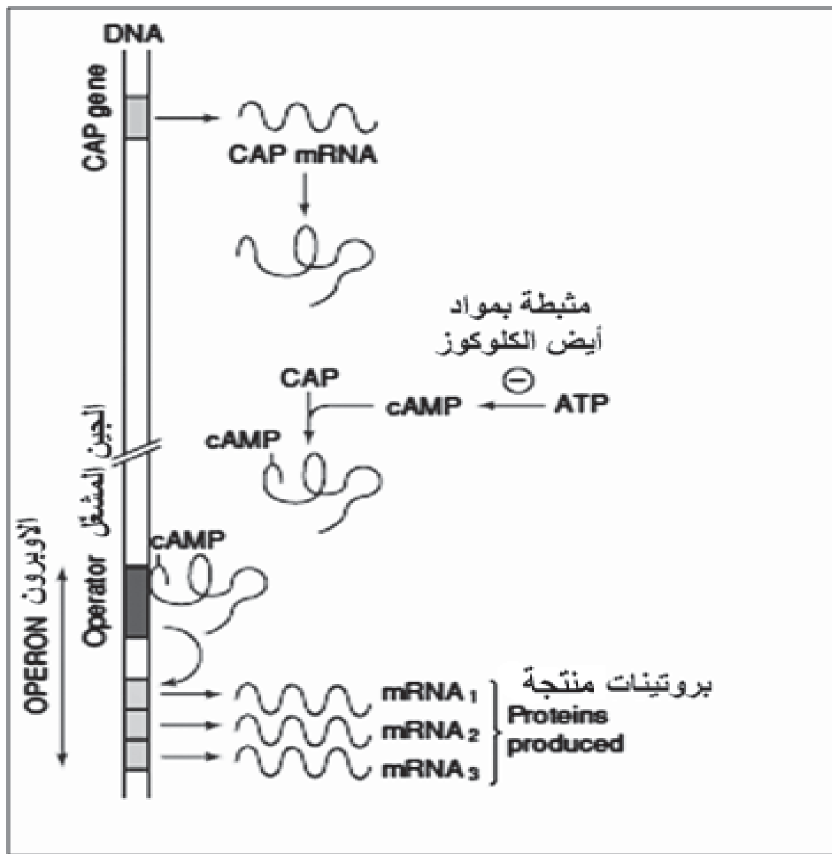
مركبات أولية ثنائية الكربون (C_2). ويطلق على هذه الآلية عملية تحفيز لصناعة الأنزيم (Enzyme synthesis induction). على العكس، يتوقف إنتاج الأنزيم ويختفي حين توقف الحاجة إليه، فمثلاً يتوقف إنتاج أنزيم تصنيع هستيدين (Histidine) عند توفر كمية كافية لاحتياجات الخلية من مركب هستيدين في الوسط الغذائي الخارجي، وتسمى هذه الحالة عملية تثبيط (Repression)، ولكن عند استهلاك أو فقدان الهيستيدين من الوسط الخارجي فإن الأنزيم يعاود إنتاجه وفعاليته بإزالة المُثبِّط (Derepressed). إن مفتاح الرئيسي لكل من عملية التثبيط أو التحفيز هو المورث المسؤول عن تصنيع البروتين، الذي يتم بدء أو إيقاف النسخ والترجمة (انظر الشكل 20.2)، أي التحفيز أو التثبيط بناء على توفر أو نقص (عدم توفر) المُركَّب في الخلية (كما هو موضح في مخطط الشكل 21.2).

5.8.2 تثبيط عمليات الهدم Catabolic repression

هذا النمط من ضبط وتنظيم الاستقلاب يرتبط بما تقدم من مبادئ الضبط بالتثبيط والتحفيز المُعتمِدة على توفر، أو عدم توفر، مواد غذائية محددة في الوسط الخارجي للخلايا الجرثومية المزروعة. إن مصطلح "تثبيط عمليات الهدم" يُعبِّر عن عدة ظواهر عامة، إحداها على سبيل المثال عندما يتوفر في الوسط الغذائي للكائن الحي، وفي نفس الوقت، مصدرين أو أكثر من الكربون، ويكون الكائن قادراً على تفضيل استعمال أحداها من دون الأخرى. على سبيل المثال، عند تواجد كلوكوز ولاكتوز معا في الوسط الغذائي فإن الخلية ستبدأ باستهلاك الكلوكوز أولاً، ولن تستهلك اللاكتوز إلا عند نفاذ الكلوكوز. هذا التسلسل أو الاختيار في الاستهلاك يُدعى "نمو باستهلاك مصدرين" (Diauxic growth). يمكن للخلية الاختيار أيضاً بين أكثر من مصدر نيتروجين حين تتوفر للخلية. ويتم الاختيار بحسب فائدة مركبات الأيض للخلية ومؤونتها، وكذلك بحسب كمية الطاقة المُنتَجة أيضاً.



الشكل 21.2: ضبط عملية تصنيع الأنزيمات من خلال ضبط تعبير وترجمة الـــDNA (DNA expression). (أ) عملية تثبيط : في حالة عدم وجود أي جزيء مُحفِّز يقوم الـــRNA الرسول (mRNA) من الجين المُنظِّم بإنتاج بروتين يرتبط بجزء من المورث في نهاية الـــDNA يلعب دور المُشغِل أو المُحرك يُعرف بـــoperator، فينتج من ذلك توقف المُشغِل وعدم بعث أية إشارة لتنشيط الجينات الهيكلية التي يفترض أن تُنتِج الأنزيمات المطلوبة. (ب) عملية تحفيز: في حالة وجود أي جزيء مُحفِّز يتعذر على البروتين (الناتج من الجين المُنظِّم) الارتباط بالمُشغِّل (operator)، هذا ما يؤدي إلى إرسال إشارة لتنشيط الجينات الهيكلية وإنتاج الأنزيمات المطلوبة.



الشكل 22.2: تثبيط بمنتج الهدم (catabolite repression). يبين المخطط أن هذه العملية تتم بمساعدة أدينوزين حلَقي أحادي الفوسفات (cAMP). يتم تنظيم الـــoperon من قِبل الجين المُشغِّل (operator gene) والذي يتم تنشيطه بواسطة بروتين يسمى CAP (Catabolite activator protein) مُتَّحداً مع cAMP، ويتم هذا الاتحاد والتنشيط في حال غياب الكلوكوز. بالتالي فإن الجين المسؤول عن هيكل الأنزيم يبقى مُثبَّطاً طالما وُجِد الكلوكوز أو أحد المركبات الناتجة من هدمه. يجدر التذكير هنا بأن العديد من الـــ operon تتأثر وتُنظّم بإشارة المُركب CAP-cAMP.

إن الآلية المُتَّبَعة في عمليات التثبيط بمُنتَج الهدم تختلف من كائن إلى آخر. أبسط مثال في هذا المجال يحصل في بكتيريا الـــ E. coli حيث يتم ضبط عملية الهدم بوجود جزيء فعال هو أدينوزين حلَقي أحادي الفوسفات (Cyclic AMP) ويُختصر بـــcAMP. في هذا الجزيء الأحادي الفوسفات (AMP) (انظر الشكل

4.2) حيث تُربَطُ مجموعة الهايدروكسيل (في موضع ´3) في سكر الريبوز مع مجموعة هيدروكسيل التابعة للفسفات (في موضع ´5)، وبالنتيجة يتكون مركب حَلقي ذا رابط فوسفوإستير ثنائي (Cyclic diphosphoester). يتحد الــcAMP مع بروتين خاص (يسمى البروتين محفِّز منتجات الهدم (Catabolite activator protein) واختصاراً (CAP)، كما يُعرف أيضاً بالبروتين المستقبل لمنتجات الهدم (Catabolite receptor protein) اختصاراً (CRP)، ثم يرتبط المركب cAMP-CAP بالــDNA مما يتسبب بإعطاء الإشارة للجينات الواقعة في أسفل موقع الارتباط (Downstream) لبدء عملية النسخ كما في الشكل (22.2). وتلي عمليةَ نسخ الــRNA الرسول عمليةُ الترجمة إلى بروتين فتُنتج أنزيمات تلعب دوراً أساسياً لهضم المادة الأولية التالية (مثل اللاكتوز في حال وجود كلوكوز ولاكتوز معاً في الوسط الغذائي). هذا النظام الإيجابي في ضبط التعبير الجيني يُشكل النقيض لنظام الضبط السلبي الموضح في الشكل 21.2.

بناء على ما سبق، يتبين أن الجزيء الذي يلعب دور المفتاح لهذه العملية هو cAMP. وطالما يتوفر الكلوكوز أو نواتجه بعد الهدم، لا يتم انتاج الــcAMP لأن نواتج هدم الكلوكوز تثبط الأنزيم المسؤول عن التصنيع والمسمى أنزيم تحلُّق الأدينيلايت أو أدنيليت سايكليز (Adenylate cyclase)، وبذلك لا يُسمح بإنتاج الأنزيمات اللازمة لهدم اللاكتوز، أي أن مُنتَج الهدم يتولى عملية التثبيط التي تزول عند اختفاء نواتج الهدم تلك، وخاصة بعد الاستهلاك الكلوكوز التام.

6.8.2 تحوير نشاط وفعاليه الأنزيم Modification of enzyme activity

بعد إنتاج الأنزيم هناك وسائل عديدة ومختلفة لتغيير وضبط نشاطه.

تحويرات بعد النسخ Post-transcriptional modifications

سُمِّيت هذه العملية "تحويرات بعد النسخ" لأن التغييرات تحصل بعد تصنيع الأنزيم المطلوب أي بعد عملية نسخه (انظر الشكل 20.2). وتقتضي عملية

التحوير انتقال الأنزيم من تشكيلة معينة إلى أخرى، إحداها ناشطة فعالة، والأخرى خاملة بدون نشاط.

أنزيم ناشط ↔ أنزيم خامل

إن عملية تنشيط الأنزيم "أ"، أو إبطال فعاليته، تتم بفعل أنزيم آخر "ب" لا علاقة له بتاتاً بصميم عملية تسريع التفاعل المسؤول عنه الأنزيم "أ".

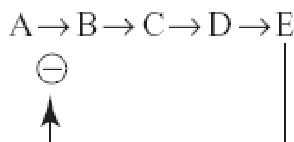
من أكثر الطرق المستعملة للتحويل من الأنزيم الناشط إلى الخامل (أو العكس) هو عملية الفسفرة التي تستدعي تدخل أنزيم آخر اسمه أنزيم فسفرة البروتين أو بروتين كاينيز (Protein kinase). هناك أنواع كثيرة من أنزيمات فسفرة البروتين، وهي عالية التخصص تتفاعل مع نوع واحد من البروتين. تقوم هذه الأنزيمات بربط مجموعة فوسفات (عادة تؤخذ من جزيء الـATP) مع مجموعة هيدروكسيل تابعة لحمض أميني محدد في الأنزيم نفسه، عادة ما يكون الحمض هو سيرين (Serine). قد يكون الأنزيم الناشط هو الذي تمت فسفرته، بينما يكون الخامل هو غير المفسفر، وقد يكون العكس بالنسبة إلى أنزيمات مختلفة. وتتم عملية إزالة الفوسفات بمساعدة أنزيمات تُزيل الفوسفات (Phosphatase). بدون أدنى شك، لا بد من ضبط وتنظيم نشاط هذين النوعين من الأنزيمات داخل الخلية، أنزيمات الفسفرة وأنزيمات إزالة الفوسفات، ويتم ضبط النشاط النوعين من الأنزيمات من خلال عوامل أخرى مرتبطة بوضع عملية الاستقلاب في الخلية.

هناك آليات أخرى لضبط نشاط الأنزيمات كإضافة (أو إزالة) جزيء صغير (غير الفوسفات) إلى حمض أميني محدد في الأنزيم، ولكن الفسفرة تبقى أكثر الآليات شيوعاً.

عمل المؤثرات Action of effectors

أما الآلية الثانية المُتَّبعة للسيطرة على نشاط الأنزيم فهي تعتمد على استجابة الأنزيم لمؤثرات (Effectors) قد تعمل إيجابياً كمحفِّز (Promoters) أو

سلبياً كمثبط (Inhibitors). كمثال على العملية نذكر التثبيط الارتجاعي (Feedback inhibition). فيما يلي عرض لتسلسل تفاعلات في عملية تصنيع:



حيث إن المنتج النهائي (E) في السلسلة يقوم بتثبيط الأنزيم الأول في مسار التفاعلات والذي يُسرِّع تحول (A) إلى (B) ما يؤدي إلى توقف المسار كله. يحصل ذلك التثبيط فقط عند تواجد كمية من (E) كافية لاحتياج الخلية، عند ذلك تنتفي الحاجة إلى استعمال المزيد من مصدر الكربون ضمن هذا المسار. مع استمرار نمو الخلية، فإن (E) سوف يُستهلك بعمليات النمو وتقل كميته المتداولة ضمن الخلية. عندها يزال التثبيط ويبدأ تحول (A) إلى (B) ويتبع ذلك إنتاج (E) الضروري للنمو وهكذا. كما تحصل عملية التثبيط الارتجاعي عند إضافة (E) إلى الوسط الغذائي، فعند توفر المركب (E) لا يجب أن تُبذِّر الخلية الطاقة لإنتاجه، وبالتالي يجب تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن مسار التصنيع. فبالإضافة إلى التثبيط الارتجاعي (Feedback inhibition)، يمكن للتركيز العالي من المنتج النهائي أن يؤدي أيضاً إلى تثبيط كل الأنزيمات في مسار التفاعلات، وذلك يؤمِّن رد فعل سريع لدى حصول ارتفاع في تركيز المنتج النهائي وضمان عدم تدفق الكربون في المسار المُثبَّط. هناك أيضاً رد فعل طويل الأمد على التركيز العالي (من المُنتَج النهائي)، بحيث يتوقف إنتاج كل أنزيمات المسار على مستوى الــDNA (كما بُيِّن سابقاً في هذا الفصل) وذلك لأن استمرارية التصنيع تعني تبذيراً للمواد الأولية الأساسية كالأحماض الأمينية.

إن عملية الضبط المبينة أعلاه يمكن أن تكون معقدة بالطبع، وذلك لأن مراحل التفاعل قد لا تسير بشكل خط مستقيم، أي أنها قد تتشعب مُنتِجة مركبات نهائية متعددة ومختلفة. تظهر أهمية ذلك خاصة في مسار التركيب الحيوي للأحماض الأمينية، على سبيل المثال، يشترك فنيل ألانين (Phenylalanine) وتايروسين (Tyrosine)

وتربتوفان (Tryptophan) في بداية مسار التصنيع الذي يتفرع بعد ذلك. هناك مناقشة مستفيضة لهذا الموضوع في الفصل الرابع عشر.

7.8.2 تكسُّر وتحلل الأنزيمات Degradation of enzymes

إن جزيئات الأنزيم قليلة الثبات، وهي قابلة للتَّفكك غير المعكوس والتكسر بسرعة ما يؤدي إلى اختفائها السريع من الخلية. تختلف فترة نصف العمر الزمنية للأنزيمات من واحدة إلى أخرى، إذ تتراوح بين عدة دقائق لبعضها البعض، وتطول لعدة أيام لأنزيمات أخرى. بالرغم من إمكانية ضبط وتنظيم صنع الأنزيم على مستوى الــDNA (انظر الفقرة 4.8.2)، إلا أن الأنزيم قد يبقى فعالاً لفترة لا بأس بها بعد إيقاف التصنيع. ولدى تغيُّر مفاجئ في الظروف البيئية قد لا يكون كافياً أن يتوقف إنتاج الأنزيم على مستوى الــDNA، وقد تحتاج الخلية إلى تثبيط جزيئات الأنزيم التي صُنِّعت مسبقاً، وذلك لتفادي هدر الطاقة من خلال تصنيع مركبات أيض غير مفيدة، أو قد تُصبح حتى مُضرَّة للخلية. ويمكن أن تتوصل الخلية إلى مُرادها من خلال التثبيط الارتجاعي (Feedback inhibition) (انظر الفقرة 6.8.2). إضافة إلى ذلك، وفي ظروف نقص في كمية النيتروجين، الضروري لتصنيع الأحماض النووية والبروتينات، فإن نمو الخلية يتوقف ويتم إنتاج أنزيمات تُحلِّل البروتين (Proteolytic enzymes أو Proteases). تتولى تلك الأنزيمات تكسير النسخ الزائدة من البروتين (والتي هي أنزيمات بطبيعتها) لتُطلق الأحماض أمينية كي يعاد استعمالها لصنع أنزيمات أخرى ضرورية. وعليه فإن الأنزيمات تتبع دورة تصنيع–تكسير (Turnover) بسرعة أكثر من عملية التفكك الشكلي لهيكل الأنزيم (Denaturation).

9.2 فعالية النمو الجرثومي Efficiency of microbial growth

سيُناقش موضوع فعالية النمو الجرثومي من ناحية ديناميكية الحرارة (Thermodynamic) في الفصل الثالث. يتم التعبير عن فعالية النمو الجرثومي

من خلال حساب كمية الإنتاج الخلوي وتقسيمها على وزن المركب المُستهلَك كمصدر للكربون (وزن الإنتاج لكل وحدة من وزن من المواد الأولية الكربونية المستهلَكة). يُعتبر "إنتاج النمو المولي" (Molar growth yield) الذي يُرمز له بــYs هو كمية الإنتاج الخلوي (الوزن الجاف) لكل مول من المواد الأولية الكربونية المستهلكة، ويُعبِّر بالتالي عن فعالية النمو. تُحسب فعالية النمو أيضاً من خلال "درجة تحويل الكربون" (Carbon conversion coefficient) وهي كمية محصول الخلايا لكل غرام من مواد الكربون الأولية، بغضّ النظر عن الوزن الجزيئي. ويساعد هذا الأخير على المقارنة الدقيقة والمجدية (ذات معنى) بين المواد الأولية ذوات الأوزان الجزيئية المختلفة.

يظهر في الجدول 3.2 تدنِّي إنتاج النمو عندما تُنقل كائنات حية مختارة (Facultative organisms) من الأجواء الهوائية إلى أجواء لاهوائية، ترتبط هذه الظاهرة كما بينا سابقاً بتدني إنتاج الطاقة عند غياب الأكسيجين.

يعتمد إنتاج النمو للكائنات المجهرية على العوامل التالية:

1- طبيعة مصدر الكربون.

2- المسارات المُتَّبَعة لهدم المواد الأولية.

3- توفُّر أي احتياط إضافي أو مواد أولية معقدة قد تُجنِّب الخلية أن تحتاج بعض مسارات البناء والتصنيع.

4- إحتياجات الطاقة الضرورية لامتصاص وتمثيل وهدم مواد مغذية أخرى كالنيتروجين مثلاً.

5- اختلافات في كفاءة التفاعلات في إنتاج الــATP.

6- وجود مواد أولية مُثبِّطة (Inhibitory substrates) أو عدم توازن الشوارد (Adverse ionic balance)، أو وجود مواد في الوسط الغذائي تفرض جهدا على نظام النقل (Transport systems) (عبر الغشاء).

7- الحالة الفسيولوجية للكائن، إذ إن كل الكائنات المجهرية تقريباً تُغيِّر طريقة نموها وتطورها حسب الظروف الخارجية وعمليات الأيض الأولية والثانوية، يترتب على ذلك اختلاف في توازن الطاقة والكتلة النهائية للخلايا.

أما في أنظمة الزارعة ذات الصفة المستمرة حيث يتم ضبط وتنظيم سرعة النمو والوضع الغذائي للخلايا (انظر الفصلان الثالث والسادس)، فهناك عوامل أخرى، منها:

8- طبيعة المادة الأولية التي تُحدِّد وتُقيِّد سرعة التفاعل (Limiting substrate): على سبيل المثال إن تحديد سرعة النمو بواسطة مادة كربون أولية مقيِّدة للنمو، هي ذات فعالية أعلى من مادة نيتروجين أولية، ففي الحالة الثانية يقوم الكائن بعمليات هدم لفائض مادة الكربون الأولية عبر مسارات أيض مُهدِرة للطاقة، ولكن قد تكون ذات فائدة للعاملين في التقانة الحيوية.

9- سرعة النمو المسموح بها (Permitted growth rate)، عندما تنخفض سرعة النمو، فإن نسبة المواد الأولية المخصصة لصيانة الخلية ترتفع، وبذلك تنخفض نسبة المواد الأولية المُستَعملة لإنتاج مواد أخرى.

أما العامل الأخير الذي يتحكم بكل الجوانب المتعلقة بفعالية الأداء الجرثومي فهو:

10- مهارة عالم الأحياء المجهرية.

الجدول 3.2 : مقارنة إنتاج النمو بين كائنات مجهرية مختلفة نامية على مواد أولية متنوعة.

المادة الأولية	الكائن الحي	"إنتاج النمو المولي" (molar growth yield) وحدة القياس (g/mol): وزن الكائن الجاف بالغرام لكل واحد مول من المادة الأولية	"درجةُ تحويل الكربون" (carbon conversion coefficient) وحدة القياس (g/g): وزن الكائن الجاف بالغرام لكل واحد غرام من مادة الكربون الأولية
ميثان	فصيلة المثيلومونص *Methylomonas sp*	17.5	1.46
ميثانول	فصيلة المثيلومونص *Methylomonas sp*	16.6	1.38
إيثانول	كانديدا يوتلاس *candida utilis*	31.2	1.30
كليسيرول	كلبسيلا نيومونيا *Klebsiella pneumoniae*	50.4	1.4
	إشيريشيا كولاي *E.coli*		
	هوائية	95.0	1.32
	لاهوائية	25.8	0.36
كلوكوز	خميرة ساكارومايسس سيريفيسييه *Saccharomyces cerevisiae*		
	هوائية	90	1.26
	لاهوائية	21	0.29
	بنيسيليوم كريسوجينم *Penicillium chrysogenum*	81	1.13
سكروز	كلبسيلا نيومونيا *Kebsiella pneumoniae*	173	1.20

زايلوس xylose	كلبسيلا نيومونيا	52.2	0.87
حمض الخليك	السيدوموناص *Pseudomonas sp*	23.5	0.98
	كانديدا يوتيلس	21.6	0.90
الهكساديكان Hexadecane	ياروريا *Yarrowia (Candida) lipolytica* كانددا محللة للدهون	203	1.06

10.2 مراجع للتوسُّع Further reading

Hames, B. D. and N. M. Hooper. *Instant Notes*: *Biochemistry*. 2nd ed. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2000.

Holms, H. "Flux Analysis: A Basic Tool of Microbial Physiology." *Advances in Microbial Physiology:* vol. 45 (2001), pp. 271-340.

Horton, H. R., L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry and D. Rawn, *Principles of Biochemistry.* 4th ed. New Jersey, USA: Pearson Education Inc., 2006.

Lengeler, J. W., G. Drews and H. Schlegel (eds.). *Biology of the Prokaryotes*. Oxford: Blackwell Science, 1999.

Moat, A. G., J. W. Foster and M. P. Spector (eds.). *Microbial Physiology*. New York: John Wiley and Sons, 2002.

White, D. *Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford: Oxford University Press, 1999.

الفصل الثالث

قياس اتحاد العناصر المتفاعلة، وحركية النمو الجرثومي من منظور ديناميكي حراري

Stoichiometry and Kinetics of Microbial Growth from a Thermodynamic Perspective

J. J. Heijnen — **جي. جي. هانين**

TV Delft, The Netherlands — **تي في ديلفت، هولندا**

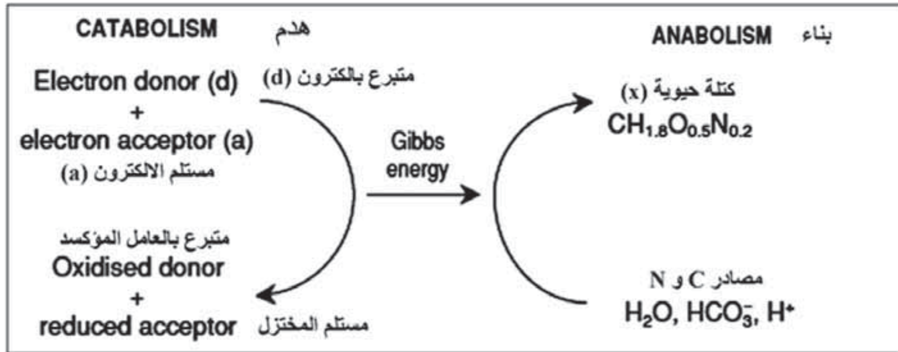
Nomenclature			**مصطلحات وتسميات**
	وحدة القياس	(الصيغة)	
concentration	$(mol_i\ m^{-3})$	تركيز	c_i
Gibbs energy produced in catabolism per mol of organic electron donor or per mol of inorganic electron donor	$(kJ\ mol^{-1})$	طاقة "جبس" الناتجة من هدم مول واحد من مُعطي إلكترون (مُختزِل) عضوي أو لكل مول واحد من معطي الكترون غير عضوي	$-\Delta G_{CAT}$
standard Gibbs energy of formation	$(kJ\ mol^{-1})$	طاقة "جبس" المعيارية للتكوين	ΔG_f^{o}

standard enthalpy of formation	$(kJ\ mol^{-1})$	طاقة التكوين الداخلية (إنثالبي) المعيارية	ΔH_f°
affinity constant	$(mol\ l^{-1})$	ثابت التآلف	K_s
maintenance coefficient of compound “i"	$(C\text{-}mol_i$ per $c\text{-}mol_x\ h^{-1})$	مُعامل صيانة المُركَّب "i"	m_i
biomass specific conversion rate of compound i	$(C\text{-}mol_i$ per $c\text{-}mol_x\ h^{-1})$	سرعة التحويل النوعي في الكتلة الحيوية للمركب "i"	q_i
specific conversion rate of compound i	$(mol_i\ m^{-3}\ h^{-1})$	سرعة التحويل النوعي للمركب "i"	r_i
reactor liquid volume	m^3	حجم السائل في المفاعل	V
biomass	C-mol	الكتلة الحيوية	X
yield of biomass (x) on compound i	$(C\text{-}mol_x$ per $mol_i)$	محصول الكتلة الحيوية "x" على المُركَّب "i"	Y_{ix}
maximal growth yield of biomass (x) on substrate (s) or electron donor (d)	$(C\text{-}mol_x$ per $C\text{-}mol_s)$	محصول نمو الكتلة الحيوية الأقصى "x" على المادة الأولية "s" أو مُعطي الإلكترون "d"	Y_{sx}^{max}
specific growth rate	h^{-1}	سرعة النمو النوعي	μ
maximum specific growth rate	h^{-1}	سرعة النمو النوعي القصوى	μ_{max}
degree of reduction		درجة الاختزال	γ

1.3 مقدمة Introduction

ظهرت الحاجة إلى معلومات كمية (Quantitative) عن نمو الكائنات الجرثومية في العديد من عمليات التخمير وعمليات معالجة النفايات الحيوية. والوسيلة النموذجية لقياس كمية النمو تعتمد على عوامل معروفة وواضحة منها محصول نمو الكتلة الحيوية الأقصى (Y_{sx}^{max} أو Y_{dx}^{max}) على مادة أولية "S" (Substrate) أو مُعطي إلكترون "D"، ومنها كذلك متطلبات الانحفاظ على صيانة (Maintenance requirements) المادة الأولية (s) أو مُعطي الإلكترون (m_s أو m_d) μ_{max} و K_s (انظر جدول التسميات أعلاه). من الناحية التطبيقية، هناك مشكلة مع هذه العوامل، إذ إن القيمة الرقمية لكل منها تتفاوت كثيراً (بعشرة أضعاف أو حتى مئة ضعف) بين أنظمة النمو المختلفة. وتتميز أنظمة النمو تلك (الشكل 1.3) بمسارات أيض هدمي تتناسب مع استعمال مُعطي ومستقبل الإلكترون المتوفر، كما تتميز بمسارات بناء تتناسب مع استعمال مصادر الكربون والنيتروجين المتوفر. بالإضافة إلى ما سبق، فإن الـــHCO_3^-، وH_2O والـــH^+ تلعب دوراً في كل نظام من أنظمة النمو. من الناحية العملية، فإن عدداً كبيراً من الكائنات الحية المجهرية تحتوي على تركيبة أولية متشابهة حيث يُرمز لـــC–مول (C-mol) من الوزن الحيوي بـــصيغة $C_1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$. تسمح هذه الصيغة باستعمال تركيبة معيارية لمكونات الكتلة الحيوية، وذلك في حال عدم توفر معلومات محددة ودقيقة بهذا الشأن. ولكن الأفضل تحديد مكونات الكتلة الحيوية بوسيلة التحليل الأولي (Elemental analysis). هذا ويُعتبر من الضروري معرفة الستوكيومتري خلال النمو وبناء الكائن الحي (Stoichiometry of growth)، وذلك لأهداف عملية. ففي طرق التخمير، تُعتبر المعلومات عن محصول الكتلة الحيوية المُنتَجة من مواد أولية (Y_{sx} أو Y_{dx})، واحتياج الأكسجين، و كمية ثاني أكسيد الكربون الناتج، والحرارة المتحررة، تُعتبر تلك المعلومات فائقة الأهمية لتصميم عملية إنتاج ذات فعالية قصوى. لذلك فإن طرق قياس

الستوكيومتري في التفاعل هو أمر أساسي وغاية في الأهمية. إضافة إلى ذلك، فإنه من المهم تخمين ستوكيومتري النمو (Growth stoichiometry) حتى في حالة أنظمة النمو الاعتباطية (Arbitrary) أو المُتَّسِمة بالعشوائية في عمليات المعالجة الحيوية للنفايات أو أية عمليات حيوية.



الشكل 1.3: عملية النمو. ارتباط وموازاة عمليات الأيض الهدمي والبنائي.

$$\frac{1}{Y_{dx}}\text{electron donor} - \frac{1}{Y_{ax}}\text{electron acceptor} + 1\ \text{C-mol biomass} + \frac{1}{Y_{hx}}\text{kJ heat}$$
$$+ \frac{1}{Y_{Gx}}\text{kJ Gibbs energy} + (\cdots)\ \text{N source} + (\cdots)\ H_2O + (\cdots)\ HCO_3^- + (\cdots)\ H^+$$

الشكل 2.3: معادلة مُبسطة تبين نِسب المركبات المتفاعلة لإنتاج C− مول واحد (C-mol) من الكتلة الحيوية. Y_{ix} هو عبارة عن إنتاج C−مول واحد من X على مول واحد أو كيلو جول من المركب "i". القوسان الفارغان (...) كناية عن مُعامل ستوكيومتري مجهول للمواد (stoichiometric-coefficient).

2.3 حساب اتحاد العناصر المتفاعلة – حساب ستوكيومتري

Stoichiometry calculation

1.2.3 تعريف نظام النمو Definition of the growth system

يمكن تبسيط معادلة التفاعلات الكيميائية لنظام النمو الجرثومي، كما في الشكل (2.3)، حيث يتكون C− مول واحد من الكتلة الحيوية، وتأخذ هذه المعادلة بعين الاعتبار كل المواد وهي مصدر النيتروجين والماء، والـ HCO_3^-، والــ

H_2Oوالــ H^+ ومُعطي إلكترون ومستقبِله، بالإضافة إلى الحرارة وطاقة "جبس" (Gibbs energy). تُقاس كمية الكتلة الحيوية بالــ C− مول (C-mol)، إذ إن واحد C−مول واحد هو وزن الكتلة الحيوية الذي يحتوي 12 غراماً من الكربون (أي ذرة واحدة من الكربون). الــC−مول الواحد يُعادِل 25 غراماً تقريباً من المادة الحيوية الجافة، لأن محتوى الكربون يشكل عادة حوالى 45 بالمئة من الوزن. الطاقة هنا ضرورية للنمو الجرثومي، وذلك لتُمكن الكائن الحي من تحويل مركبات كربون بسيطة إلى مركبات معقدة ضمن كتلته الحيوية. تُنتَج تلك الطاقة من تفاعلات اختزال/ وأكسدة (Redox) متوازية بين مُعطي إلكترون ومستقبِله. لا يُعد قياس الحرارة المتحررة من التفاعلات هو الطريقة الأفضل لقياس الطاقة المستخدمة في النمو، إنما يجب قياس طاقة "جبس" والتي تُختصر بــΔG، وهي تُعبِّر عن مساهمة كل من الطاقة الداخلية، أنثالبي (Enthalpy) التي تُختصر بــΔH ، والطاقة غير المتوفرة (تسمى درجة الاعتلاج) أو أنتروبي (Entropy) التي تُختصر بــ ΔS. وعليه فإن المعادلة بين تلك العوامل هي ($\Delta G=\Delta H-T\Delta S$). إن مُعاملات ستوكيومتري (Stoichiometric coefficients) في التفاعل، المُبيَّن في الشكل 2.3، ترتبط بمُعامِل محصول الكتلة الحيوية (Yield coefficient) الذي يمكن قياسه ومعرفته بشكل جيد. ترمز الــ Y_{dx}، والــ Y_{ax}، والــ Y_{hx}، والــ Y_{gx} إلى مُعامِلات قياس محصول الكتلة الحيوية (وحدة القياس بالــC−مول من الكتلة الحيوية C-mol biomass) بالنسبة إلى مُعطي الإلكتروني (لكل C−مول واحد من المادة العضوية أو لكل مول واحد من المركب غير العضوي)، أو بالنسبة إلى مستقبِل الإلكترون (لكل مول واحد من المُستقبِل)، أو بالنسبة إلى الحرارة (لكل كيلوجول واحد) أو بالنسبة إلى طاقة "جبس" (لكل كيلوجول واحد)، ذلك حسب تسلسلها في هذا النص. بالنسبة إلى الكتلة الحيوية فإنه يتم استعمال تركيبة واحد C−مول فقط. تُعبِّر علامة الطرح (-) في كل المعادلات عن عملية استهلاك.

2.2.3 قياس المحصول Measuring yields

إن مُعامِلات قياس محصول الكتلة الحيوية Y_{ix} هي عبارة عن نسبة (Ratio) سرعات التحول (Conversion rates)، حيث تكون وحدة قياس r_x هي

C– مول كتلة حيوية بالمتر المكعب في الساعة ($C\text{-mol biomass } m^{-3}\ h^{-1}$)، بينما وحدة قياس r_i هي مول "i" بالمتر المكعب بالساعة ($mol\ i\ m^{-3}\ h^{-1}$).

$$y_{ix}= \frac{r_x}{r^i} \qquad 1.3$$

تُحسب سرعات التحول بالاعتماد على توازنات كتلة صحيحة من خلال أخذ قياسات خلال التجربة العملية، سواء كانت التجربة مُصمَّمه بإعطاء مواد غذائية بشكل دفعات (Batch)، أو بشكل تغذية مستمرة (Continuous culture) حيث تُعطى المادة الغذائية للخلايا باستمرار، أو دفعات–إطعام (fed-batch) التي تُشكل حالة وسطية بين الاثنين السابقين. من أكثر المُعامِلات (التي تؤشر إلى ستوكيومتري في التفاعل) اعتماداً واستعمالاً والتي تُقاس دائماً هو محصول الكتلة الحيوية (Biomass yield) بالنسبة إلى المادة الأولية (Y_{sx}) أو بالنسبة إلى مُعطي الإلكترون (Y_{ax}). ففي نظام batch حيث يكون الحجم ثابتاً (0 يمثل لحظة الصفر أو البداية) تكون معادلة Y_{sx} كالتالي:

$$Y_{sx}=(c_x- c_{xo})/(c_{so} – c_s) \qquad \text{(أ) } 2.3$$

في حاله الاستقرار الكيميائي (Chemostat) حيث تتساوى سُرعة استهلاك المواد الداخلة في التفاعل وسرعة الإنتاج للمواد، يمكن تطبيق معادلة مشابهة، حيث c_{xo} تساوي صفر، ويستعاض عن الـــ c_{so} بتركيز المادة الأولية الداخلة c_{si}. أما إذا طرأ تغير في الأحجام فهناك معادلة أكثر تعقيداً تُشتَق من توازنات الكتل. بالنسبة إلى المفاعلات التي تتغذى بالدفعات (Batch reactors) حيث يكون الحجم الابتدائي V_0والحجم المتغير هو V، وعندها ستكون المعادلة كما يلي:

$$Y_{sx} = (V_{cx}- V_oc_{xo})/(V_oc_{so} – Vc_s) \qquad \text{(ب) } 2.3$$

3.2.3 تأثيرات الصيانة Maintenance effects

في البداية تم التعريف بـــY_{sx} على أنه مُعامل ثابت. ولكن بعد إدخال مفهوم الاستقرار الكيميائي (Chemostat)، بَيَّنت زراعة الكائنات المجهرية في

ظروف تؤدي إلى نموّ أقل بكثير من المستوى الأقصى (μ_{max})، بأن مُعامل Y_{sx} يعتمد على سرعة النمو النوعي (Specific growth rate) رمزها μ. ويمكن تبرير ذلك من خلال مفهوم التنفس الداخلي (Endogenous respiration) أو الصيانة (Maintenance). يَفترِض هذا المفهوم أن صيانة الوظائف الخلوية يتطلب توفر دفق من طاقة "جبس" (من أجل إعادة سد النواقص، وتصليح البروتينات المهدمة... إلخ). تُنتَجُ طاقة "جبس" من عملية هدم وتكسير (على سرعة معينة) للمركبات التي تُعطي إلكترون (Substrate). تُدعى هذه السرعة بسرعة الصيانة (m_s أو m_d) وتكون وحدة القياس بـــ C–مول من المادة الأولية لكل C – مول من الكتلة الحيوية في الساعة، وتبين ذلك المعادلة التالية:

$$\frac{1}{Y_{sx}} = \frac{1}{Y_{sx}^{max}} + \frac{m_s}{\mu} \qquad 3.3$$

من الناحية التجريبية، يتم قياس Y_{sx} في حالة الاستقرار الكيميائي وفي ظروف سرعات مختلفة للنمو النوعي μ (أنظر الفصل السادس). إنطلاقاً من القيم التي تم قياسها لـــY_{sx} و μ يمكن أن نحسب باستعمال المعادلة (3.3) الظروف المثالية للحصول على أعلى مستوى محصول Y_{sx}^{max} وصيانة m_s.

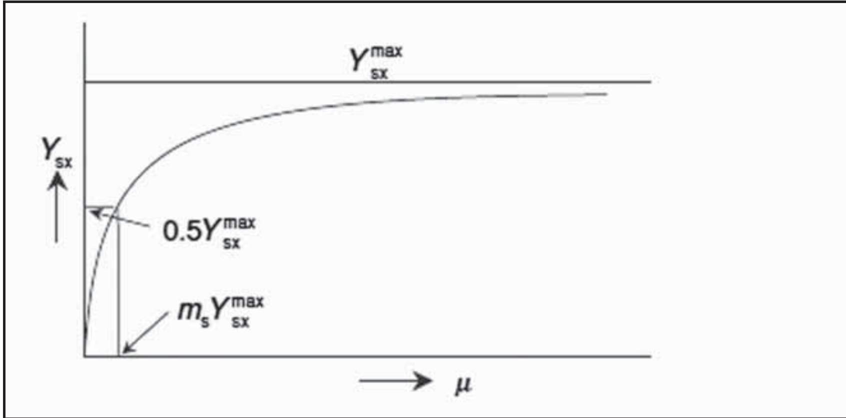
يبين الشكل 3.3 كيفية اعتماد Y_{sx} على μ:

ــ إذا كانت قيمة μ عالية تقترب Y_{sx} من الحد المثالي الأقصى Y_{sx}^{max}

ــ إذا كانت قيمة μ متدنية تنخفض Y_{sx} بشكل ملحوظ وتصبح مساوية لنصف قيمة Y_{sx}^{max} عندما تكون المعادلة $\mu = m_s Y_{sx}^{max}$.

في معظم العمليات التقليدية حيث يكون النمو على درجة حرارة اعتيادية، فإن تأثير الصيانة في المحصول يكون قليلاً يمكن إهماله عندما تكون $\mu<0.05\ h^{-1}$. ويعني ذلك أنه في عمليات التغذية على دفعات (Batch culture) أثناء النمو الأُسِّي (Exponential growth) تكون الـــ μ تساوي تقريباً الحد الأقصى ($\mu \approx \mu_{max}$) و $Y_{sx} \approx Y_{sx}^{max}$. بينما في عمليات الدفعات–إطعام (Fed-batch) التي تُشكل الوضع

الطبيعي في معظم التطبيقات الصناعية، حيث تكون $\mu<0.05\ h^{-1}$، فإن جانب الصيانة يطغى على محصول الكتله الحيوية. وكذلك في التطبيقات البيئية للكائنات تكون قيمة μ قليلة أيضاً، وعليه تكون جوانب الصيانة في صميم الموضوع.



الشكل 3.3: اعتماد محصول الكتله الحيوية Y_{sx} (biomass yield) على سرعة النمو النوعي (تأثير الصيانة)، m_s هي مُعامِل صيانة المادة الأولية (substrate maintenance coefficient). Y_{sx}^{max} هي أقصى محصول من الكتلة الحيوية من كم معين من المواد الأولية.

4.2.3 مبادئ انحفاظ في عملية حساب كامل ستوكيومتري النمو

Conservation principles to calculate the full stoichiometry of growth

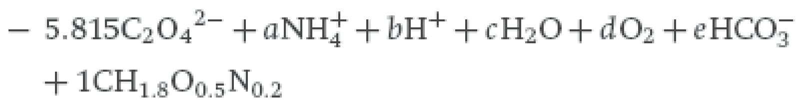
يبين الشكل 2.3 وجود مُعامِلات كثيرة لقياس الستوكيومتري إلى جانب Y_{sx} أو Y_{dx} . ولحسن الحظ، لا يتطلب تحديد تلك المُعاملات من خلال التجربة العملية. من خلال تطبيق مبادئ الانحفاظ، يمكن في أغلب الأحيان حساب قيمة المُعامِلات كلها إذا تم قياس قيمة واحدة منها (Y_{sx}). في ما يلي مثال يشرح عملية الحساب بناء على مبادئ الانحفاظ:

استعمال مبادئ انحفاظ في عملية حساب كامل معاملات الستوكيومتري

Conservation principles to calculate the full stoichiometry of growth

لنأخذ كائنات مجهرية هوائية تنمو على أوكزاليت (Oxalate) وتستعمل NH_4^+ كمصدر نيتروجين N، من خلال القياس تبين أن قيمة محصول الكتلة

الحيوية هي 1/5.815 C–مول X لكل مول أكزاليت ($C\text{-}mol\ X\ mol^{-1}$ oxalate). يتم استعمال التركيبة المعيارية للكتلة الحيوية. يكون التفاعل الإجمالي التالي (بناء على الشكل 2.3) ومُستنِداً إلى أن إنتاج كل C–مول واحد من الكتلة الحيوية يقتضي استهلاك 5.815 مول من أوكزاليت :



$$-\ 5.815C_2O_4^{\ 2-} + aNH_4^+ + bH^+ + cH_2O + dO_2 + eHCO_3^- + 1CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$$

هناك خمسة مُعامِلات في حساب الستوكيومتري مجهولة (أ إلى هـ) ضمن هذا التفاعل، يمكن لنا كتابة خمس معادلات بناء على خمس حالات من ضرورات ومقيِّدات مبدأ الانحفاظ (Conservation constraints):

الانحفاظ على الكربون $0 = 1 + e + 11.63 -$

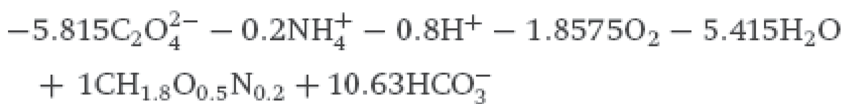
الانحفاظ على الهيدروجين $0 = 1.8 + 1e + 2c + b + 4a$

الانحفاظ على الأكسجين $0 = 0.5 + 3e + 2d + c + -23.26$

الانحفاظ على النيتروجين $0 = 0.2 + a$

الانحفاظ على الشحنة $0 = e - b + a + 11.63+$

لدى حل المعادلة يتبين أن الستوكيومتري الكاملة للمعادلة هي:



$$-5.815C_2O_4^{2-} - 0.2NH_4^+ - 0.8H^+ - 1.8575O_2 - 5.415H_2O + 1CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 10.63HCO_3^-$$

لذلك نرى أن:

$$Y_{sx} = 1/1.8575\ C\text{-}mol\ x\ mol^{-1}\ O_2$$

$$Y_{sx} = 1/10.63\ C\text{-}mol\ x\ mol^{-1}\ HCO_3^-$$

بالنسبة إلى مجمل التفاعل، وباستعمال قيم ΔH_f^θ و $\Delta G_f^\theta 1$ من الجدول 1.3، يمكن لنا أن نحسب قيمة كل من ($-\Delta H_r$) و (ΔG_r)، وبالتالي نحصل على قيمة $1/Y_{hx}$ وقيمة $1/Y_{gx}$.

5.2.3 توازن درجة الاختزال **Balance of degree of reduction**

إن تطبيق ضرورات ومقيِّدات مبدأ الانحفاظ (Conservation constraints) هي مقاربة مباشَرة. هناك طريقة مختصرة لتلك العملية الحسابية من خلال تطبيق درجة توازن الاختزال (Degree of reduction balance). ويُرمز لدرجة الاختزال بـــγ وهي محددة ومعروفة لكل مُركَّب وهي عبارة عن كمية ستوكيومترية، ويتم اعتبار قيمتها بناء على أن γ=0 بالنسبة إلى المركبات المُعتمدة كمرجع (Reference compounds) وهي H_2O و H^+، HCO_3^- و SO_4^{2-} و NO_3^- و Fe^{3+} ومصدر النيتروجين. يتم حساب قيمة "γ" لكل واحد من المركبات من خلال حساب تفاعل الأكسدة والاختزال النصفي (Redox half reaction) الذي بواسطته يتحول المركب إلى المادة السابقة وهي المادة الكيميائية المرجع (Reference chemical) وإلى عدد من الإلكترونات. ستكون قيم "γ" الرقمية هي عدد الإلكترونات الناتجة من مول واحد من المواد العضوية وغير العضوية. على سبيل المثال فإن درجة اختزال الأكسجين O_2 تنبثق عن تفاعل نصفي من الأكسدة والاختزال كما يلي:



$$O_2 + 4H^+ \rightarrow 4e^{'} + H_2O$$

حيث γ= 4-

بالنسبة إلى الكلوكوز فإن التفاعل النصفي للأكسدة والاختزال هو:



$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \rightarrow 6HCO_3^- + 30H^+ + 24\,e^-$$

حيث γ = 24 إلكترون بالمول من الكلوكوز (Electrons mol^{-1} glucose)

لا بد من التذكير هنا بأنه غالباً ما تُقاس "γ" في المركبات العضوية بالنسبة إلى عدد الكربون في المادة الأولية (per C-mol of carbon source) وعليه فإن قيمة "γ" للكلوكوز تصبح $\left(\gamma = \frac{24}{6} = 4\right)$

باستعمال تفاعل نصفي من الأكسدة والاختزال، يمكن حساب قيمة "γ" للذرة الواحدة، وكذلك للشحنة الكهربية الواحدة (أنظر الجدول 2.3). على سبيل المثال، نحصل بالنسبة إلى ذرة الكربون على ما يلي:



$$C + 3H_2O \rightarrow HCO_3^- + 5H^+ + 4e^-$$

حيث $\gamma = 4$

بنفس الطريقة يمكن حساب قيمة "γ" لكل من H، O، S، N، وللشحنة السالبة، والشحنة الموجبة كما يبين الجدول 1.3. ونلاحظ في الجدول 3.3 بأن قيمة "γ" لذرة النيتروجين (الموجود في الكتلة الحيوية وأيضا الموجود في مصدر النيتروجين) تعتمد على نوع المادة الأولية المستعملة للنمو كمصدر نيتروجين. مثلاً، عند استعمال الامونيوم NH_4^+ كمصدر نيتروجين نجد في الجدول 3.3 ("γ" بالنسبة إلى ذرة النيتروجين تساوي 3-) أن درجة الاختزال ستكون $1 - 4 + (-3) = 0$. أما درجة الاختزال للجزيء فهي عبارة عن كمية الإلكترونات المتوفِّرة (المُحرَّرة منه) بعد أكسدته إلى مركبات سابقة مرجعية (Reference compounds). بالنسبة إلى المركبات العضوية، يتم تعديل عدد الإلكترونات المتوفرة بالنسبة إلى العدد C–مول (per C-mol)، أما بالنسبة إلى المواد غير العضوية فيتم التعديل بالنسبة إلى المول (per mol).

يُبيِّن الجدول 1.3 بأن قيمة "γ" للجزئيات العضوية تتراوح بين 0 و8. وبالنسبة إلى الكتلة الحيوية (بتركيبها النمطي المعياري) (Standard composition) فهي كما يلي:

الجدول 1.3: طاقة "جبس" المعيارية، والإنثالبي (Enthalpy) ودرجات اختزال المركبات ذات الصلة (298 K, pH = 7.1, bar, 1mol^{-1}) بمنظومة النمو.

اسم المركب	الصيغة التركيبية	ΔG_f^{o} (kJ mol^{-1})	ΔH_f^{o} (kJ mol^{-1})	درجات الاختزال (C-atom^{-1})
الكتلة الحيوية	$CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$	-67	-91	4.2 (مصدر نيتروجين= $NH4^{+}$)
الماء	H_2O	-237.18	-286	-0
بيكربونات	HCO_3^-	-586.85	-692	0
ثاني أكسيد الكربون	CO_2	-394.359	-394.1	0
بروتون	H^+	-39.87	0	0
أكسجين (غاز)	O_2	0	0	−4
اوكزاليت$^{2-}$ (Oxalate^{2-})	$C_2O_4^{2-}$	-674.04	-824	+1
أول أوكسيد الكربون	CO	-137.15	-111	+2
فورمايت$^-$ (formate$^-$)	CHO_2^-	-335	-410	+ 2
كلايوكسيلايت$^-$ (glyoxylate$^-$)	$C_2O_3H^-$	-468.6	−	+2
تارترايت$^{2-}$ (tartrate^{2-})	$C_4H_4O_6^{2-}$	-1010	−	+2.5
مالونيت$^{2-}$ (malonate^{2-})	$C_3H_2O_4^{2-}$	-700	−	+2.67
فيومارايت$^{2-}$ (fumarate^{2-})	$C_4H_2O_4^{2-}$	-604.21	-777	+3
مالايت$^{2-}$ (malate^{2-})	$C_4H_4O_5^{2-}$	-845.08	-843	+3
ستريت$^{3-}$ (citrate^{3-})	$C_6H_5O_7^{3-}$	-1168.34	-1515	+3
بايروفيت$^-$ (pyruvate$^-$)	$C_3H_3O_3^-$	-474.63	-596	+3.33
سكسينيت$^-$ (succinate^{2-}) 2	$C_4H_4O_4^{2-}$	-690.23	-909	+3.50
كلوكونيت$^-$ (gluconate$^-$)	$C_6H_{11}O_7^-$	-1154	-	+3.67
فورملديهايد (formaldehyde)	CH_2O	130.54	-	+4
أستيت$^-$ (acetate$^-$)	$C_2H_3O_2^-$	-369.41	-486	+4

+5.33	-	-445.18	$C_3H_6O_3$	ديهايدروكسي أسيتون (dihydroxyacetone)
+4	-687	-517.18	$C_3H_5O_3^-$	لاكتيت⁻ (lactate⁻)
+4	-1264	-917.22	$C_6H_{12}O_6$	كلوكوز (glucose)
+4.33	–	-942.61	$C_6H_{14}O_6$	مانيتول (mannitol)
+4.67	-676	-488.52	$C_3H_8O_3$	كلسيرول (glycerol)
+4.67	-	-361.08	$C_3H_5O_2^-$	بروبيونيت⁻ (propionate⁻)
+5	-	-330.50	$C_2H_6O_2$	إثيلين كليكول (ethylene glycol)
+5	–	-280	$C_4H_8O_2$	أسيتوين (acetoine)
+5	-535	-352.63	$C_4H_7O_2^-$	بيوتيريت (butyrate)
+5.33	–	-327	$C_3H_8O_2$	بروباين ديول (propanediol)
+5.50	–	-322	$C_4H_{10}O_2$	بيوتاين ديول (butanediol)
+6	-246	-175.39	CH_4O	ميثانول (methanol)
+6	-288	-181.75	C_2H_6O	إيثانول (ethanol)
+6	-331	-175.81	C_3H_8O	بروبانول (propanol)
+6.13	-439	+60	$C_{15}H_{32}$	nــألكين سائل (n-alcane liquid
+6.66	-104	-24	C_3H_8	بروباين (غاز) propane (g)
+7	-85	-32.89	C_2H_6	إيثاين (غاز) [ethane (g)]
+8	-75	-50.75	CH_4	ميثاين (غاز) [methane (g)]
+2	0	0	H_2	هيدروجين (غاز)
+8	-133	-79.37	NH_4^+	أمونيوم (ammonium)
+10	0	0	N_2	نيتروجين (nitrogen)
+2	-107	-37.2	NO_2^-	أيون النيريت (nitrite)
0	-173	-111.34	NO_3^-	أيون النترات (nitrate)
+1	-87	-78.87	Fe^{2+}	حديد II (iron II)
0	-4	-4.6	Fe^{3+}	حديد III (iron III)

الكبريت (sulfur)	S^0	0	0	+6
سلفات الهيدروجين [hydrogen (غاز) sulfide (g)]	H_2S	-33.56	-20	+8
أيون سلفيت (sulfide ion)	HS^-	+12.05	-17	+8
شاردة سلفايت (sulfate ion)	SO_4^{2-}	-744.63	-909	0
شاردة ثايوسلفات (thiosulphate ion)	$S_2O_3^{2-}$	-513.2	-608	+8
أمونيوم (ammonium)	NH_4^+	-79.37	-133	+8

γ_x = 4.2 ناتجة من العملية $4.2 = 0.2(-3) + 0.5(-2) + 1 \times 1.8 + 4 \times 1$

وذلك للأمونيا NH_4^+ كمصدر نيتروجين

γ_x = 5.8 وذلك لــ NO_3^- كمصدر نيتروجين

ولأنه تتم الانحفاظ على الإلكترون فمن الممكن حساب درجات توازن الاختزال كما يبين المثال التالي:

الجدول 2.3 : درجات الاختزال "γ" للذرات والشحنات

الذرات وشحناتها ($atoms\ charge^{-1}$)	γ
H	1
O	-2
C	4
S	6
N	+5
Fe	+3
شحنة موجبة (1+)	-1
شحنة سالبة (1−)	+1

الجدول 3.3 : درجة اختزال N الموجود في مصدر النيتروجين وفي الكتلة الحيوية	
مصدر النيتروجين خلال النمو	γ للنيتروجين
NH_4^+	-3
N_2	0
NO_3^-	+5

تطبيق تعادل درجة الاختزال **Balance of degree of reduction**

لننظر إلى المثال السابق عن النمو الهوائي على مادة أوكزاليت، حيث يشتمل التفاعل الكيميائي الإجمالي على المواد المتفاعلة $C_2O_4^{2-}$، NH_4^+، H^+، H_2O، O_2، HCO_3^-، والكتلة الحيوية هي ($C_1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$). إن حساب درجة الاختزال (باستعمال قِيم "γ" للذرات والشحنات المبينة في الجدول 3.3) لكل جزيء أوكزاليت ($C_2O_4^{2-}$) تعطي $\gamma = 2 \times 4 + 4 \times (-2) + (+2) = 2$

إن قيمة γ للكتلة الحيوية (NH_4^+ هي مصدر الكربون، لذلك تكون "γ" للنتروجين تعادل 3− بحسب الجدول 3.3 وباستعمال $C_1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$) على اعتبارها مصدر النيتروجين، وبالنتيجة فإن قيمة γ لذرة النيتروجين =3- حسب ما ورد في الجدول (3.3) وكذلك باستخدام $C_1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ للكتلة الحيوية، وتكون طريقة الحساب كما يلي:

$$4.2 = 0.2\ (-3) + 0.5\ (-2) + 1.8 \times 1 + 1 \times 4$$

وبنفس الطريقة فان درجة اختزال الأكسجين O_2 ستكون 4-، وبالنسبة إلى الـــHCO_3^- نحصل على:

$$0 = 1 + (-2) \times 3 + 4 \times 1 \ + 1 \times 1 \ = \gamma$$

وبالنسبة إلى الأمونيا NH_4^+ كمصدر نيتروجين (باستعمال ما جاء في كل من الجدول 2.3 و 3.3) فسنحصل على:

$$0 = 1 - 4 + -3 = \gamma$$

وأيضاً بالنسبة إلى بقية المركبات في التفاعل (H_2O و H^+) فإن $\gamma = 0$.
ويعطي ذلك لتوازن درجة الاختزال المُنطبِقة على تفاعل النمو:

$$0 = 4.2 + (-4d) + -5.815 \times 2$$

من خلال هذا التوازن يمكن أن نبين أن مُعاملات الستوكيومتري هي فقط للمادة الأولية (Substrate) أي مُعطي الإلكترون، ولمستقبل الإلكترون وللكتلة الحيوية. وعليه يتبين أن قيمة d تساوي 1.8575− التي تتطابق مع الحل الكلي السابق بشأن مقيِّدات الانحفاظ Conservation constraints. أما بالنسبة إلى باقي المُعامِلات الأخرى فهي تتبع من الطريقة العادية للمقيِّدات الانحفاظ، مثلاً يُحسب مُعامل النيتروجين بناء على توازن النيتروجين، ومُعامل HCO_3^- بناء على توازن الكربون، وهكذا. في هذا المثال نشير لعدة نقاط مهمة وهي:

- يُظهر توازن درجة الاختزال دائماً وجود علاقة خطية (linear) بين مُعاملات الستوكيومتري لمُعطي الإلكترون ومُستقبِله من جهة، والكتلة الحيوية من جهة أخرى، ما يجعل هذه العلاقة ذات فائدة عملية كبيرة.
- إن توازن درجات الاختزال لا يعتبر عاملاً مُقَيِّداً جديداً، بل هو اتحاد مناسب بين مقيِّدات الانحفاظ لكل من C، وH، وN والشحنات.

هناك تطبيقات مفيدة وتفصيلات أخرى لمقيِّدات الانحفاظ في المراجع المذكورة في نهاية الفصل.

3.3 تخمين الستوكيومتري بناء على مبدأ تَبدُّد الطاقة عند "جبس"

Stoichiometry predictions based on Gibbs energy dissipation

هناك عدة طرق مقترحة لتخمين محصول الكتلة الحيوية (Y_{dx}) باستخدام الارتباطات (correlations). من الطرق البسيطة والحديثة والمفيدة هناك طريقة تعتمد على الثرموديناميك وتستخدم طاقة "جبس" المُستَهلَكة لكل وحدة قياس من الكتلة الحيوية ($1/Y_{gx}$) والتي تُقاس بالكيلوجول بالــC−مول من المادة الأولية ($kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ X$) وعليه:

$$\frac{1}{Y_{gx}} = \frac{1}{Y_{gx}^{max}} + \frac{m_g}{\mu}$$ معادلة 4.3

حيث m_g هي السرعة النوعية لاستهلاك طاقة "جبس" لإنتاج الكتلة الحيوية بهدف الصيانة، وتكون وحدة القياس كيلوجول C–مول X بالساعة $(kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ X\ h^{-1})$. أما Y_{gx}^{max} فهي الكتلة الحيوية القصوى المُنتَجة من طاقة "جبس" وتكون وحدة القياس C–مول X بالـــكيلوجول $(C\text{-}mol\ X\ kJ^{-1})$.

تبين المعادلة 4.3 بأن طاقة "جبس" المستهلكة تشتمل على عنصر أو عامل متعلق بالنمو والصيانة. وقد اقتُرِح ارتباط (أو علاقة) مبسط بين $1/Y_{gx}^{max}$ مع الـــ m_g. وهذه العلاقة تنطبق على أنظمة نمو جرثومي متنوعة وبدرجات حرارة مختلفة تتغذى على مواد عضوية (Heterotrophic)، أو ذاتية التغذية (Autotrophic)، هوائيه، لاهوائية، ونظام نمو طارد للنيتروجين (Denitrifying growth system)، وعلى مواد كربون أولية متنوعة، باستخدام RET وهو نظام نقل الإلكترون عكسياً (Reversed Electron Transport).

1.3.3 رابطة الحاجة إلى طاقة جبس في الصيانة

Correlation for maintenance Gibbs energy

يُعتبر الارتباط المبين في المعادلة التالية مناسباً وساري المفعول لطاقة "جبس" للصيانة:

$$m_g = 4.5 \exp\left[-\frac{69\,000}{8.314}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right] \quad 5.3$$

ينطبق هذا الارتباط إذا كانت درجة حرارة تتراوح بين 278K إلى 348K في ظروف هوائية ولاهوائية. ومن الواضح بأن m_g لا تعتمد على مصدر الكربون ولا على مُعطي أو مستقبل الإلكترون، ولكن تعتمد فقط وبشكل كبير على درجة الحرارة. يبدو هذا منطقياً حيث إن عمليات الصيانة تحتاج فقط إلى طاقة "جبس"، بغضّ النظر عن الاتحاد معطي/مستقبل الإلكترون الذي يؤمِّن طاقة "جبس".

2.3.3 رابطة طاقة جبس "جبس" الضرورية للنمو

(Correlation for Gibbs energy needed for growth)

بالنسبة إلى احتياجات طاقة "جبس" المرتبطة بالنمو $1/Y_{gx}^{max}$ (ذات وحدة القياس بالــكيلوجول من طاقة "جبس" بالــC–مول من المُنتج X (kJ Gibbs energy C-mol^{-1} X produced)) يمكن استعمال الارتباطات المبينة في المعادلات التالية:

إذا كانت التغذية على مواد عضوية، أو إذا كانت التغذية ذاتية من دون حاجة إلى RET يكون الارتباط كما يلي:

$$\frac{1}{Y_{gx}^{max}} = 200 + 18(6 - c)^{1.8} + \exp\{[(3.8 - \gamma_s)^2]^{0.16}(3.6 + 0.4c)\} \quad (أ)\ 6.3$$

أما إذا كانت التغذية ذاتية تحتاج إلى RET فيكون الارتباط كما يلي:

$$\frac{1}{Y_{gx}^{max}} = 3500 \quad (ب)\ 6.3$$

ففي المعادلة الأولى 6.3 (أ) يتبين بأن $1/Y_{gx}^{max}$، في حالة التغذية على مواد عضوية، تعتمد على طبيعة مصدر الكربون قيد الاستعمال، والذي يتميز بدرجة الاختزال، γ_s، وبعدد ذرات الكربون (المؤشر c) في المُركب المُستَعمل كمصدر كربون (مثلاً C = 6 و γ_s = 4 إذا كان المصدر هو كلوكوز). تبين المعادلة 6.3 (أ) بأن قيمة $1/Y_{gx}^{max}$ تتراوح بين 200 و1000 كيلوجول من طاقة "جبس" مطلوبة لتصنيع C–مول واحد من الكتلة الحيوية، وذلك بحسب مصدر الكربون المُستَعمَل. إذا كان الكلوكوز هو مصدر الكربون فإن الطاقة المُستهلكة ستكون قيمتها ضمن المجال الأدنى، بينما ينطبق المجال الأعلى لقيمة الطاقة في حال كان أول أكسيد الكربون CO هو المُستهلَك كمصدر كربون. بالإضافة إلى ذلك، يتبين أن قيمة الــ $1/Y_{gx}$ ترتفع كلما كان عدد ذرات الكربون (في مصدر الكربون) أقل، على أن تكون درجة الاختزال أكبر أو أصغر من العدد التقريبي 3.8.

يعود سبب ذلك إلى أنه إذا كان مصدر الكربون ذا عدد قليل (من ذرات الكربون) فإن عملية تصنيع مركبات C_4 وإلى C_6 تقتضي عمليات وتفاعلات كيميائية وحيوية عديدة لإنتاج تلك المركبات المطلوبة الضرورية لبناء الكتلة الحيوية. إضافة إلى أن درجة الاختزال للكتلة الحيوية تكون حوالى 4، وبالتالي فإن استعمال أي مصدر كربون أكثر اختزالاً أو أكسدةً من الكتلة الحيوية، أي تختلف درجة اختزاله (عن 4)، يتطلب تفاعلات كيميائية حيوية من الأكسدة والاختزال (بالتتابع المناسب) لتجعله مناسباً للاستعمال. من هنا يتبين أن بأن القيمة العالية للـــ $1/Y_{gx}^{max}$ تعكس احتياجاً لعدد أكبر من التفاعلات الكيميائية الحيوية التي تستدعي استهلاكاً أعلى من طاقة "جبس". والمثال على ذلك تصنيع الكتلة الحيوية من ثاني أكسيد الكربون CO_2 (γ_s = 0، C = 1)، فبحسب المعادلة 6.3 (أ) فإن كمية طاقة "جبس" الضرورية والمطلوبة لذلك هي 986 كيلوجول بالــC− مول X (kJ C-mol^{-1} X). ولكن استعمال الكلوكوز (γ_s = 4، C = 6) سيتطلب فقط 236 كيلوجول بالــC− مول X (kJ C-mol^{-1} X) من طاقة "جبس". يُترجم هذا الاختلاف احتياج تفاعلات أكثر لتحقيق النمو المطلوب عند الاعتماد على ثاني أكسيد الكربون كمصدر كربون.

ولتخمين قيمة الــ $1/Y_{gx}^{max}$ في حال التغذية الذاتية (Autotrophic) لا بد أولاً من معرفة إذا ما كنا بحاجة إلى RET. يتحقق ذلك من خلال وضع تفاعل بناء الكتلة الحيوية انطلاقاً من ثاني أكسيد الكربون وباستخدام معطي الإلكترون المتوفر، كمصدر للإلكترون. وإذا كانت قيمة ΔG_r لهذا التفاعل أكبر من الصفر بكثير ($\Delta G_r >> 0$) فيعني ذلك أن مستوى الطاقة في المركب المعطي للإلكترون هو غير كافٍ لاختزال الــ CO_2 إلى كتلة حيوية. على الكائنات المجهرية إذاً أن تقوم بتحويل جزء من المركب معطي الإلكترون إلى مستوى طاقة أعلى باستخدام عملية الــ RET. كمثال على الثنائي من المتبرعين بالإلكترون ذوي الطاقة المتدنية، نذكر:

- Fe^{2+}/Fe^{3+}
- NO_2^-/NO_3^-

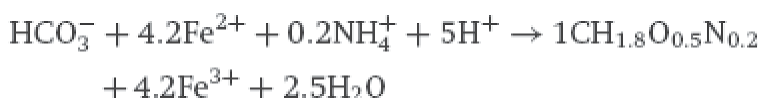
بالنسبة إلى معطي الإلكترون الذي يحتاج إلى RET فإن قيمة $1/Y_{gx}^{max}$ ستكون 3500 كيلوجول بالــC− مول X ($kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ X$) كما في المعادلة 6.3 (ب). يُبين ذلك أن RET تحتاج إلى خطوات عديدة إضافية من التفاعلات الكيميائية الحيوية التي بدورها تحتاج إلى طاقة "جبس" أعلى.

بالنسبة إلى التغذية الذاتية، فإن معطيات الإلكترون مثل H_2/H^+ أو CO/CO_2 لا تحتاج إلى RET. بالنسبة إلى مُعطِيات الإلكترون المذكورة، فإن قيمة الــ $1/Y_{gx}^{max} \approx 1000$ كيلوجول بالــC− مول X ($kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ X$)، كما تبينه المعادلة 6.3 (ب) حيث $\gamma_s = 0$ و $c = 1$ (CO_2 هو مصدر الكربون).

حدوث نقل الإلكترون عكسياً في التغذية الذاتية

Occurrence of reversed electron transport (RET) in autrophic growth

لنأخذ كائنات جرثومية هوائية تنمو باستخدام Fe^{2+}/Fe^{3+} كثنائي معطي للإلكترون، باستعمال HCO_3^- مصدراً للكربون. في هذه الحالة في هذه الحالة يمكن كتابة التفاعل (البنائي) لتكوين الكتلة الحيوية، كما هو مبين أدناه، حيث يتم اختزال HCO_3^- من خلال استعمال معطي للإلكترون وكما يلي:



$$HCO_3^- + 4.2Fe^{2+} + 0.2NH_4^+ + 5H^+ \rightarrow 1CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 4.2Fe^{3+} + 2.5H_2O$$

وباستخدام الجدول 1.3 يمكن حساب قيمة $\Delta G_r^{01} = +454$ كيلوجول.

وعليه فمن الواضح ضرورة استعمال الثنائي Fe^{2+}/Fe^{3+} RET للتبرع بالإلكترون، وتنطبق على هذه الحالة المعادلة 6.3 (ب).

3.3.3 توقعات الستوكيومتري باستعمال ارتباطات طاقة "جبس"

Stoichiometric predictions using the Gibbs energy correlations

يمكن استعمال الارتباط بين m_g و $1/Y_{gx}^{max}$ المبين في المعادلات 5.3 و 6.3 (أ) و (ب) بهدف تخمين أو توقُّع (لكل أنظمة النمو الجرثومي) ستوكيومتري النمو في معادلة تعتمد على:

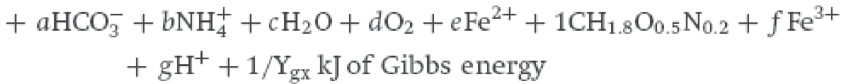
- مصدر الكربون المستخدم.
- ثنائي معطي/مستقبل الإلكترون.
- سرعة ونسبة النمو.
- درجة الحرارة.

ثبت بالنسبة إلى العديد من أنظمة نمو الجراثيم أن بالإمكان تخمين Y_{dx} ضمن مجال 0.01 إلى 1 C–مول X بالمول من معطي الإلكترون (1 C- donor $mol\ X\ mol^{-1}$) مع دقة نسبية بحوالى 10– 15 %. ويبين المثال التالي عملية حساب كاملة للستوكيومتري.

تقديرات الستوكيومتري لعمليات النمو باستعمال ارتباطات طاقة "جبس"

Stoichiometric predictions using the Gibbs energy correlations

لنأخذ مثالاً نمو كائن مجهري بالتغذية الذاتية في نظام هوائي، باستخدام Fe^{2+} إلى Fe^{3+} كمعطٍ للإلكترون وفي درجة حرارة 50 درجة مئوية (50ºC)، وبنسبة نمو 0.01 بالساعة (h^{-1})، وبمقياس حموضة pH = 1.5، و باستخدام الأمونيا NH_4^+ كمصدر نيتروجين. إن تفاعل النمو (المبين فيما يلي) يمكن تخصيصه وتحديده لإنتاج C–مول واحد X (One C-mol X) وذلك باستعمال سبعة مُعامِلات ستوكيومترية مجهولة تم الرمز إليها من a إلى g:



$$+\ aHCO_3^- + bNH_4^+ + cH_2O + dO_2 + eFe^{2+} + 1CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + fFe^{3+} + gH^+ + 1/Y_{gx}\ \text{kJ of Gibbs energy}$$

يمكننــا تخصيــص وتحديــد ستة مُقيِّــدات انحفاظ (Conservation constraints) وتوازن طاقة "جبس" للتمكن من حساب مُعامِلات الستوكيومتري السبعة المجهولة من a إلى g. إذا استعملنا المعادلة 4.3، فإن $1/Y_{gx}$ يختصر من الارتباطات، كما هو مبين أدناه (علمًا أن RET تتدخل وأن μ= 0.01 بالساعة (h^{-1}) وأن الحرارة T = 323 كلفن (K)):

$1/Y_{gx}$ = 3500 + 38.48/0.01 = 7348 كيلوجول بالــC–مول من X (kJ ($C\text{-}mol^{-1}$ X

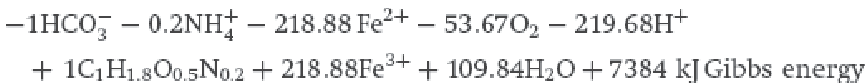
تكون المعادلات الست لمقيِّدات الانحفاظ وتوازن طاقة "جبس" (باستخدام قيمة ΔG_f^θ = 1 من الجدول 3.1، كالأتي:

انحفاظ الكربون	$0 = 1 + a$
انحفاظ الأكسجين	$0 = 0.5 + 2d + c + 3a$
درجات الاختزال	$0 = 4.2 + e + -4d$
انحفاظ الحديد	$0 = f + e$
انخفاظ النيتروجين	$0 = 0.2 + b$
انحفاظ الشحنات	$0 = g + 3f + 2e + b + -a$

وتوازن طاقة "جبس" ستكون

$$(-586.85)\ a + (-79.37)b + (-237.18)c + (-78.87)e + (-67)d + (-$$
$$4.6)\ f + (-8.54)g + 7384 = 0$$

لا بد من الملاحظة هنا بأنه بالنسبة إلى H^+، فقد تمت إعادة حساب ΔG_f بين حموضة 7 ($pH = 7$) (في الجدول 2.3) إلى حموضة 1.5 ($pH = 1.5$) وهذا ما يُغيير ΔG_{H+} من 38.87- إلى 8.54- كيلوجول لكل مول H^+ (H^+ kJ mol). أيضاً هناك توازن درجة الاختزال الذي استُعمِل كمُقيِّد (يحل مكان مُقيِّد الــH). بعد حل تلك المعادلات الخطية الست (Linear equations) نحصل على الستوكيومتري الكامل كالتالي:



$$-1HCO_3^- - 0.2NH_4^+ - 218.88\,Fe^{2+} - 53.67O_2 - 219.68H^+$$
$$+ 1C_1H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + 218.88Fe^{3+} + 109.84H_2O + 7384\ \text{kJ Gibbs energy}$$

ومن خلال الستوكيومتري التي حصلنا عليه يمكننا كذلك أن نحسب قيمة حرارة النمو (heat of growth) باستعمال قيمة ΔH_f^θ من الجدول 1.3 وسنجد إنتاجاً من الحرارة يساوي 12620 كيلوجول.

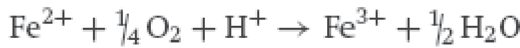
4.3.3 العلاقة الجبرية في حساب اتحاد العناصر المتفاعلة

Algebraic relations to calculate stoichiometry

باعتبار أن كل مُعامِلات الستوكيومتري، من خلال مُقيِّدات الانحفاظ، مرتبطة بالــ $1/Y_{gx}$ فإنه من الممكن اشتقاق علاقة جبرية جديدة بين $1/Y_{ix}$ و $1/_{gx}$ باستخدام بعض الفرضيات المُبَسِّطة. كمثال على ذلك نعطي العلاقة التالية لمحصول الكتلة الحيوية بالنسبة إلى معطي الإلكترون Y_{dx}:

$$Y_{dx} = \frac{(-\Delta G_{CAT})}{1/Y_{gx} + \gamma_X/\gamma_d \, (-\Delta G_{CAT})} \qquad 7.3$$

حيث إن ΔG_{CAT} يرمز إلى طاقة "جبس" في تفاعل هدم مول واحد من معطي إلكترون عضوي، أو مول واحد من معطي إلكترون غير عضوي بالــكيلوجول بالنسبة إلى C–مول واحد من معطي الإلكترون (kJ C-mol^{-1} donor)، إن γ_x و γ_d ترمزان إلى درجة اختزال كل من الكتلة الحيوية ومُعطي الإلكترون لكل مول (mol^{-1}). وبالنسبة إلى المثال السابق يكون تفاعل الهدم لمول واحد من معطي الإلكترون كما يلي:



$$Fe^{2+} + \tfrac{1}{4} O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + \tfrac{1}{2} H_2O$$

باستخدام قيم $\Delta G_f^{\theta 1}$ من الجدول 1.3 مع قيمة ΔG_f في درجة حموضة 1.5 (pH = 1.5)، وهي 8.54- كيلوجول للــH^+ (kJ mol^{-1} for H^+)، سنحصل على ΔG_{CAT}=35.78- كيلوجول لكل مول Fe^{2+} (kJ mol^{-1} Fe^{2+}). بالإضافة إلى أن قيمة γ_x = 4.2، و γ_d = 1، و $1/Y_{gx}$ = 7384 كيلوجول لكل مول X (kJ mol^{-1} X) ، ويؤدي ذلك إلى قيمة Y_{dx} = 0.0047 C–مول X لكل مول Fe^{2+} (C-mol X mol^{-1} Fe^{2+}). وعليه يتبين بأن مُعامِل ستوكيومتري "e" يساوي 215 مول Fe^{2+} لكل C–مول X (mol Fe^{2+} C-mol^{-1} X)، وهذه القيمة قريبة جداً من القيمة المحسوبة وهي 218.9 مول Fe^{2+} لكل C–مول X (mol Fe^{2+} C-mol^{-1} X). تبين المعادلة 7.3 ما يلي:

- ترتفع قيمة Y_{dx} بشكل مفرط (hyperbolic) مع ازدياد طاقة "جبس" المُنتَجة من تفاعل الهدم ($-\Delta G_{CAT}$). وهذا ما يبرر أن تكون قيمة Y_{dx} في نظام النمو اللاهوائي (مع قيمة $\Delta G_{CAT}-$ متدنية) أقل، كما في الظرف الهوائي.
- تكون قيمة Y_{dx} أعلى في الظروف التي تتطلب كمية أقل من طاقة "جبس" لتصنيع الكتلة الحيوية. ويعني ذلك قيمة أقل لـــ$1/Y_{gx}$ عندما تكون سرعة النمو النوعي μ مرتفعة، ودرجة الحرارة متدنية نسبياً، وتوفر نوع مصدر الكربون المفضل والمناسب وعدم وجود نقل الإلكترون عكسياً الـــRET.
- تعتمد Y_{dx} بشكل مفرط (Hyperbolic) على بديل μ، $1/Y_{gx}$ باستخدام المعادلة 4.3 بسبب تأثير عامل الصيانة بما يتوافق مع المعادلة 3.3.
- يبلغ الحد الأقصى النظري لـــY_{dx} قيمة γ_d/γ_x C–مول X لكل مول من معطي الإلكترون (C-mol X per mol^{-1} electron donor) وذلك بناء على قانون الثرموديناميك الحرارية الثاني الذي يحدد أيضاً القيمة الدنيا لـــ$1/Y_{gx}$ بصفر كيلوجول لكل C–مول X (kJ C-mol^{-1}X).

5.3.3 تخمين وتقدير محصول النمو في المواد الأولية غير التقليدية وتفاعلات الهدم

Estimation of growth yields for non-conventional substrates and catabolic reactions

إن ارتباطات الـــ $1/Y_{gx}^{max}$ تستند إلى نمو الكائنات الجرثومية على مواد أولية تقليدية تحتوي على أقل من ست ذرات من الكربون بالجزيء، التي تتصل مباشرة بعمليات الأيض الأولية. في التقانة الحيوية البيئية، هناك كثير من المواد الأولية، مثلاً العطرية (Aromatics) كالبنزين (Benzene)، والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (Polycyclic aromatic hydrocarbons) أو PAH، والمخلبيات الكيميائية (Chelators) مثلاً النايتريلو ثلاثي حمض الخل (Nitrilo triacetic acid) أو NTA، ولا تتسرب تلك المركبات مباشرة إلى مسارات الأيض

الأولية. لذلك هناك مسارات خاصة ضرورية تشمل أنزيمات تضيف ذرة أو ذرتين من الأكسجين (Mono and dioxygenases) لتحويل مركبات غير اعتيادية إلى مركبات وسيطة (بايروفيت مثلا) تتدرج في أيض الخلية. إن الأكسجين المستهلك في هذه المسارات الخاصة لا يؤدي إلى إنتاج طاقة أيض، ولكنه يُنتِج الحرارة فقط. وهناك طرق ووسائل تُستخدم لتقدير قيمة المحصول المنتج في هذه الحالة، ولكنها معقدة. هناك طريقة مبسطة وأسهل تقتضي استخدام المعلومات حول التحويل بالأكسدة (Oxidative conversion) للمواد غير التقليدية إلى مركبات أيض وسيطة. يُنتِج هذا التفاعل عادة الحرارة فقط. أما بالنسبة إلى مُنتَجات الأيض الأولية الناتجة منه، فإنها ستستخدم كمصدر كربون وطاقة لعملية النمو، وعليه يمكن أن يُحسب ستوكيومتري النمو هنا باستخدام المعادلة 5.3 و6.3 (أ) و (ب)، كما بيننا ذلك في المثال المذكور في الفقرة 3.3.3. والمثاليين التاليين يوضحان العملية:

ستوكيومتري النمو (قياس نسب العناصر) في البنزين

Growth stoichiometry on benzene

يتحول البنزين (C_6H_6) بواسطة كائنات مجهرية إلى هايدروكسي ميوكونك شبيه الألديهايد (Hydroxymuconic semi aldehyde) ($C_6H_5O_4^-$) حسب التفاعل التالي:



$$C_6H_6 + 2O_2 + C_6H_5O_4^- + H^+$$

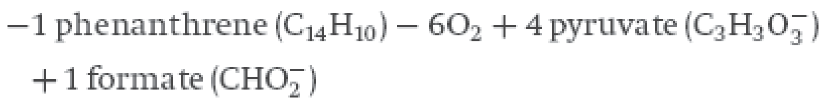
ولا يُنتِج هذا التفاعل طاقة "جبس" ناتجة من الاتحاد مع الأكسجين (Oxygenation). ولكن مركب الأيض الوسيط الناتج من التفاعل، هايدروكسي ميوكونك شبيه الألديهايد، هو المصدر الحقيقي للكربون والطاقة المطلوبين للنمو. وتبلغ قيمة ΔG_{CAT} = 2516 كيلوجول لكل مول من هايدروكسي ميوكونك شبيه الألديهايد. يبين تطبيق المعادلة 6.3 (أ)، حيث c=6 و γ =22/6 =3.666 ، إن قيمة $1/Y_{gx}^{max}$ = 233 كيلوجول لكل C–مول X ($kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ X$). ويبين تطبيق المعادلة 7.3، حيث γ_x =4.2 و γ_d =22الكترون لكل مول من هايدروكسي ميوكونك شبيه الالديهايد، إن قيمة Y_{dx} = 3.75 C–مول X لكل C–مول بنزين

(C-mol^{-1} X mol^{-1} benzene). وهذه القيمة قريبة من القيمة المُقاسة وهي 1.20 g X^{-1} g^{-1} بنزين (التي تعادل 3.42 C–مول X لكل مول بنزين (C-mol X mol^{-1} benzene)، باستعمال 90% مادة عضوية في الكتلة الحيوية و24.6 غرام كتلة حيوية عضوية C-mol^{-1} X).

ستوكيومتري النمو في الفينانثرين

Growth stoichiometry on phenanthrene

يتحول الفينانثرين بواسطة إنزيمات الاكسيجيناز (Oxygenases) إلى بايروفيت وفورميت حسب المعادله التالية:



$$-1\ \text{phenanthrene}\ (C_{14}H_{10}) - 6O_2 + 4\ \text{pyruvate}\ (C_3H_3O_3^-) + 1\ \text{formate}\ (CHO_2^-)$$

إن الأكسجين المُستهلك يؤدي فقط لإنتاج الحرارة، أما محصول الكتلة الحيوية فهو مُكون من بيروفايت وفورمايت. ويتم حساب محصول الكتلة الحيوية من البايروفايت من ΔG_{CAT} = 1048.74 كيلوجول لكل مول بايروفايت (kJ mol^{-1} pyruvate) و $1/Y_{gx}^{max}$ = 373 كيلوجول، وذلك باستخدام المعادلة 6.3 (أ) حيث c = 3 و γ_s= 3.333، والمعادلة 7.3 حيث إن γ_X= 4.2 و γ_d = 10 إلكترون لكل مول بيروفايت (Electrons mol^{-1} pyruvate). وهي تساوي 1.29 C–مول X لكل مول من البايروفايت (C-mol X mol^{-1} pyruvate) . قيمة محصول الكتلة الحيوية المُعتمِدة على الفورميت (ΔG_{CAT} = 251.85 كيلوجول لكل مول فورمايت (kJ mol^{-1} formate) و $1/Y_{gx}^{max}$ = 651 كيلوجول لكل C–مول X (kJ C-mol^{-1} X)، γ_d = 2) ستساوي 0.213 C–مول X لكل مول فورميت (C-mol X mol^{-1} formate). فيصبح محصول الكتلة الحيوية في النمو على الفينانثرين يساوي 4 x 1.29 + 1 x 0.213 = 5.37 C–مول X لكل مول من الفينانثرين (C-mol X mol^{-1} phenanthrene) بينما القيمة المُقاسة هي 6.5 (C-mol X mol^{-1} phenanthrene). والفرق هنا هو حوالى 18%، والسبب في

ذلك يعود إلى أنه في حالة الفينانثرين لا يتم صرف طاقة لنقل البايروفيت أو الفورميت عبر الغشاء الخلوي، الأمر الذي يسبب خللاً طفيفاً في تخمين محصول الكتلة الحيوية للنمو على كل من البايروفيت والفورميت.

توضح هذه الأمثلة أنه يمكن تطبيق إنتاجية الثرموديناميك على مواد أولية غير تقليدية شريطة أن تتوفر المعلومات حول خطوة التحوير بالاتحاد مع الأكسجين (Oxygenation) إلى مركبات أيض وسيطة ومعروفة.

في مجال التطبيق المتعلق بالجيوكيمياء الحيوية (Bio-geochemical) وفي ظروف النمو البيئية القصوى (غير اعتيادية)، مثل الرغبة في النمو في وسط قاعدي (Alkalophilic)، أو في وسط ذي تركيز أملاح عال، في تلك الحالات تتم تفاعلات أيض هدمي متنوعة تشمل معادن و ظروف نمو متطرفة. في هذه الحال تُصبح عملية حساب طاقة "جبس" للهدم باستعمال الثرموديناميك أكثر تعقيداً.

6.3.3 عقبات أمام استعمال تخمين المحصول على مبدأ الثرموديناميك

Limitation of the yield prediction using the thermodynamic approach

لقد مكَّنتنا الطرق التي تم عرضها سابقاً من تخمين قيمة Y_{sx}، حيث تم تجاهل الكثير من تفاصيل الكيمياء الحيوية في عمليات أيض المواد الأولية التقليدية، التي تُميِّز أنواع الكائنات المجهرية المختلفة. وقد يُعتبر هذا من إيجابيات الطرق المُتَّبَعة لأننا لا نحيط بالكثير من تلك التفاصيل في معظم الأحيان. بعض تلك التفاصيل والمعلومات مطلوبة بالنسبة إلى المواد الأولية غير التقليدية فقط، كما أوضحنا ذلك في المقطع 5.3.3. ولكن لا بد لنا أن نتذكر بأن الاختلافات الكيميائية الحيوية هي عامل مؤثر ومرتبط بالنتيجة. فمثلاً تم قياس Y_{sx} لعملية تخمر الإيثانول من الكلوكوز في خمائر السكارومايس (Saccharomyces cerevisiae) وقيمتها حوالى 0.15 C–مول X لكل مول كلوكوز (C-mol X $C\text{-}mol^{-1}$ glucose) ونحصل على نفس القيمة لـــY_{sx} باستخدام طرق التخمين والحساب أعلاه. ولكن الخميرة زايموموناس موبيليس (Zymomonas mobilis)

تقوم بتخمير الإيثانول بــقيمة Y_{sx}=0.07، ويعود هذا الفرق في قيمة Y_{sx} إلى اختلاف في مسارات التفاعلات الكيميائية الحيوية (مسار تحليل السكر Glycolysis مقابل مسار Entner-Doudoroff route ــ انظر الفصل الثاني). يبين هذا المثال أنه عند وجود اختلاف كبير بين قيمة الــY_{sx} المُخمَّنة حسابياً والقيمة التي قيست عملياً، فإن ذلك قد يكون مؤشراً على وجود مسارات جديدة غير اعتيادية للتفاعلات الكيميائية الحيوية في عمليات أيض الهدم أو البناء.

4.3 حركية النمو من منظور الثرموديناميك

Growth Kinetics From a thermodynamic point of view

تتميز حركية النمو بمتغيرين أو مؤشرين اثنين، هما μ_{max} و K_s. من البديهي أن قيمة K_s قابلة للتغيُّر بحسب دخول معطي الإلكترون (المواد الأولية) إلى داخل الكائن المجهري بواسطة الانتشار السلبي (Passive diffusion)، أو بواسطة النقل المُسهَّل (Facilitated transport) أو بواسطة النقل الناشط (Active transport). لذلك لا يمكن وضع ارتباط عام للثرموديناميك بالنسبة إلى K_s. وهو غير ممكن أيضاً بالنسبة إلى μ_{max} حيث تتغير قيمتها في مجال واسع بين 0.001 إلى 1 بالساعة (h^{-1}) حسب نوع الأحياء المجهرية وظروف الزرع. ولكن قد يبدو معقولاً ومناسباً أن نتوقع بأنه عندما تكون قيمة السرعة النوعية القصوى لإنتاج طاقة "جبس" (من عمليات الهدم) منخفضة، فستكون قيمة سرعة النمو النوعية القصوى منخفضةً أيضاً. وباستخدام هذا المفهوم من محدودية الطاقة، يمكن اشتقاق المعادلة التالية للسرعة النوعية لإنتاج طاقة "جبس" q_G^{max} (kJ C-mol^{-1} biomass h كيلوجول لكل C–مول من الكتلة الحيوية في الساعة).

$$q_G^{\max} = 3[(-\Delta G_{\text{CAT}})/\gamma_{\text{d}}] \exp\left[\frac{-69\,000}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right] \qquad 8.3$$

إن العلاقة المُبينة في المعادلة أعلاه قد بنيت على ما يلي:

- سرعة نقل الكترون قصوى وهي 3 مول، من الإلكترون لكل C–مول X بالساعة (mol electrons C-mol^{-1} X h) في درجة حرارة 298 K، وتنتج قيمة مُعامل 3 في المعادلة 8.3.

– تأثير درجة الحرارة في هذه السرعة حسب علاقة أرهينياس (Arrhenius relation) مع طاقة تنشيط قيمتها 69000 جول لكل مول ($J\ mol^{-1}$) أي أن السرعة تتضاعف كلما ارتفعت درجات الحرارة 10 درجات مئوية وR هو الثابت الغازي الذي تكون قيمته 8.314 جول لكل مول لكل درجة حرارة كلفن ($J\ mol^{-1}\ K$).

– إن السرعة القصوى لإنتاج طاقة "جبس" من عمليات الهدم (q_G^{max}) تساوي سرعة نقل الإلكترون مضروبة بـــ $-\Delta G_{CAT}/\gamma_d$، والتي هي طاقة الهدم المتحررة من نقل مول واحد من الإلكترونات في تفاعل معطي/ مستقبل الإلكترون (Electron donor/acceptor reaction).

نحصل على قيمة μ_{max} بالساعة (h^{-1}) (حسب المعادلة التالية) من خلال ربط المعادلة 8.3 المتعلقة بالسرعة القصوى لإنتاج طاقة "جبس" الهدمية، مع المعادلة 5.3 التي تُعبرّ عن طاقة "جبس" المطلوبة للنمو في ظروف السرعة القصوى (وهي تساوي مجموع μ_{max}/Y_{gx} مع الصيانة، وتبلغ قيمتها 4.5 أضعاف مُعَدِّل أو مُصحِّح الحرارة (temperature correction). المعادلة بعد الربط كما يلي:

$$\mu_{max} = \frac{[3(-\Delta G_{CAT})/\gamma_d - 4.5]}{1/Y_{gx}^{max}} \exp\left[\frac{-69\,000}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right] \qquad 9.3$$

تعطي المعادلة 9.3 تخميناً لقيمة μ_{max} عند كائنات مجهرية مختلفة، منها الـــnitrifiers المنتجة للنايترات، والـــ methanogens المنتِجة لغاز الميثان، والهوائية التي تتغذى على المواد العضوية (Heterotrophic aerobes).

5.3 مراجع للتوسُّع Further reading

Amend, J. P. and E. L. Shock, "Energetics of Overall Metabolic Reactions of Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea and Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews:* vol. 25 (2001), pp. 175-243.

Heijnen, J. J. “Bioenergetics of Microbial Growth.” in: M. C. Flickinger and S. W. Drew, eds., *Encyclopedia of Bioprocesstechnology, Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. New York: John Wiley and Sons, 1999.

Heijnen, J. J. and J. P. van Dijken, “In Search of a Thermodynamic Description of Biomass Yields for the Chemotrophic Growth of Microorganisms.” *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 39 (1992), pp. 833-858.

Heijnen, J. J., M. C. M. van Loosdrecht and L. Tijhuis, “A Black Box Mathematical Model to Calculate auto- and Heterotrophic Biomass Yields Based on Gibbs Energy Dissipation.” *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 40 (1992), pp. 1139-1154.

L. Tijhuis, M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen, “A Thermodynamically Based Correlation for Maintenance Gibbs Energy Requirements in Aerobic and Anaerobic Chemotrophic Growth.” *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 42 (1993), pp. 509-519.

J. M. van Briesen, “Thermodynamic Yield Predictions for Biodegradation through Oxygenase Activation Reactions.” *Biodegradation:* vol. 12 (2001), pp. 265-281.

H. V. K. van dam Westerhoff, *Mosaic Non-equilibrium Thermodynamics and the Control of Biological Free Energy Transduction*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

R. T. J. M. van der Heijden, J. J. Heijnen, C. Hellinga, B. Romein and K. Ch. A. M. Luyben, “Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I Classification of the Calculability and the Balanceability of Conversion Rate.” *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 43 (1994), pp. 3-10.

R. T. J. M. van der Heijden, B. Romein, J. J. Heijnen, C. Hellinga and K. Ch. A. M. Luyben, “Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: II Diagnosis and Estimation of gross errors. *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 43 (1994), pp. 11-20.

R. T. J. M. van der Heijden, B. Romein, J. J. Heijnen, C. Hellinga and K. Ch. A. M. Luyben, “Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: III Sequential Application of Data Reconciliation for Sensitive Detection of Systematic Errors.” *Biotechnology and Bioengineering:* vol. 44 (1994), pp. 781-791.

الفصل الرابع

تدبير الجينوم وتحليله في الخلايا بدائية النواة (البروكاريوت)

Genome Management and Analysis: Prokaryotes

كولن هاروود — **Colin R. Harwood**
جامعة نيوكاسل، المملكة المتحدة — **University of New Castle, UK**
انيل ويبات — **Anil Wipat**
جامعة نيوكاسل، المملكة المتحدة — **University of Newcastle, UK**

1.4 المقدمة Introduction

إن التلاعب بالمورث يدخل في صميم تقانة مُستعملة في مجالات وتطبيقات شتى، سواء كانت أكاديمية أو صناعية. فبالإضافة إلى كون هذه الأداة التحليلية فائقة القوة، فإنها تُستعمل للأهداف التالية: **أولاً**، زيادة كم ونوع محصول مُنتَجٍ متوفرٍ أصلاً، كالبروتينات، ونواتج الأيض، أو حتى خلايا كاملة؛ ثانياً، تطوير وتحسين مميزات وصفات المنتج من خلال الهندسة البروتينية؛ **ثالثاً**، إنتاج مواد متوفرة أصلاً، ولكن باستعمال مسارات وتفاعلات مختلفة (هندسة مسارات التفاعل (Pathways engineering)، **ورابعاً**، تطوير وإنتاج مواد جديدة لا توجد في الطبيعة (التركيب الحيوي المُوجه أو المهجن Directed or hybrid biosynthesis).

يُفتَرض بقارئ هذا الفصل معرفة الأسس والمعلومات حول تركيب الحمض النووي وخصائصه، وحول كيفية تنظيم المعلومات الوراثية في المورثات والأوبرون المنظم (Operon)، وحول الميكانيكية التي تستخدمها البكتيريا لنسخ وترجمة المعلومات المُشفَّرة بهدف تصنيع البروتينات (انظر أيضاً الفصل الثاني).

الجدول 1.4 : مجال المقاسات الاعتيادية للمواد الوراثية الموجودة في البكتيريا	
المادة الوراثية	**مجال المقاس بالــbp** [أ]
ترانسبوزون (transposon)	30000 - 800
بلازميد (plasmid)	150000 -1000
فيروس أولي أو بروملتهم (prophage)	300000 -3000
صبغي البكتيريا (الكروموسوم)	9450000 -600000

(أ) عدد أزواج القواعد الأمينية في الحمض النووي (Base pairs).

2.4 كروموسومات (صبغيات) البكتيريا وطرق نقل طبيعية للمورث

Bacterial chromosomes and natural gene transfer

1.2.4 كروموسومات البكتيريا Bacterial chromosomes

الكروموسومات هي مخزن المعلومات الوراثية، وموضع التعبير عن هذه الجينيات (Gene expression) وهي بالتالي الناقل الأساس للمواد الوراثية. إن مصطلح كروموسرم (Chromosome) يعني حرفياً أجسام ذات صبغة داكنة، أو مواد صبغية، وهو مصطلح استُعمِل للمرة الأولى لتسمية تلك المركبات في الخلايا ذيات النواة الحقيقية (Eukaryolic cells) لدى فحصها بالمجهر الضوئي (Light microscope). ثم توسعت التسميه لتشمل المراكبات المادية التي تحمل شفرة المعلومات الوراثيه في كل الكائنات الحية. أما مصطلح جينوم (Genome) فإنه يُستعمل كمفهوم شبه تجريدي للتعبير عن كل المعلومات الوراثيه عند الكائن الحي. واصطلاح نيوكليويد (Nucleoid) يُطلق على الكتلة المادية التي يمكن عزلها واستخلاصها من خليه البكتيريا وتحتوي على الكروموسوم، وقد تحوي أيضاً على

RNA وبروتين. بالإضافة إلى الكروموسوم في البكتيريا، فقد تم اكتشاف عوامل وراثية أخرى قابلة للنسخ والمضاعفة (Replicating genetic material) وتشمل بلازميد (Plasmids)، وفيروسات أولية، وبروملتهم (prophage)، وعوامل وراثية مُنتَقِلة (Transposable genetic material) التي يطلق عليها اسم ترانسبوزون (Transposons). يبين الجدول 1.4 مجالاً لمقاسات المواد الوراثية المتنوعة المتواجدة في البكتيريا.

تأخذ المواد الوراثية في البكتيريا شكل ضفيرة ثنائية أو شريط مزدوج من الــDNA (dsDNA = double-stranded DNA). إن القواعد النووية (Nucleotide base) في المواد الوراثية لا تخضع للتغيير في الحالة الطبيعية عدا إضافة المثيل (Methyl)، الذي يخدم في الأهداف التالية: **أولاً** تمييز الجديلة القديمة المُحفوظة (Conserved strand) من تلك الجديدة بعد عملية المضاعفة (Replication). **ثانياً** حماية DNA الخلية من نشاط أنزيماتها المُحلِّلَة للحمض النووي أي نيوكليايز (Nucleases)، و**ثالثاً** برمجة توقيت بعض مراحل دورة حياة الخلية (Timing certain cell cycle events). يحتوي العديد من الفيروسات أيضاً على ضفيرة ثنائية من الــDNA (ds DNA) كمصدر للمعلومات الوراثية كما في مجموعة T-ملتهم وλ-ملتهم (T-phages, lambda phage)، بينما تحتوي فيروسات أخرى على جدلة واحدة من الــDNA (ssDNA أي Single-stranded DNA) مثل الفيروس ΦX174 و M13، وبعضها يحتوي على جدلة واحدة من RNA (ssRNA) مثل فيروس MS2 أو جدلتين من RNA (dsRNA) كما في روتوفيروس (Rotovirus). يختلف حجم الكروموسوم بين أنواع الميكروبات اختلافاً بيِّناً يصل إلى عشرة أضعاف (انظر الجدول 2.4)، كما يوجد اختلاف في العدد والمكونات والشكل الطوبولوجي (Topology). وقد يعكس حجم الجينوم درجة التعقيد في تركيب الكائن الحي وطريقة معيشته. فالبكتيريا المجبرة على التطفل (Obligate bacterial parasites) مثل بعض مايكوبلازما جينيتاليوم (Mycoplasma genetalium) تحتوي على جينوم صغير نسبياً (580 kbp)، بينما تحتوي بكتيريا معقده مثل الستربتومايسيز سيليكولور (Streptomyces coelicolor) على جينوم

من (8.6 Mbp) أي 8.6 مليون من أزواج القواعد، وتحتوي بكتيريا ميكسوكوكس زانثص (Myxococcus xanthus) عادة على جينوم كبير الحجم (9.45 Mbp). لقد تم تحديد التسلسل الجيني الكامل (Genome sequence) لأكثر من 250 بكتيريا حقيقية (Eubacteria)، وأركيا (Archaea) وكائنات مجهرية بسيطة حقيقية النواة.

الجدول 2.4: مقارنة صفات الكروموسومات عند الفيروسات والبكتيريا والفطريات بما يتعلق بالحجم التركيب والشكل الوصفي (Topology)

الكائن الحي	النوع	العدد	حجم	الحمض النووي	طوبولوجي الحمض النووي
MS2	ملتهم بكتيري	1	3.6 Knt	ssRNA	دائري
ΦX174	ملتهم بكتيري	1	5.4 Knt	ssDNA	خطي
Lambda	ملتهم بكتيري	1	48. 5kbp	dsDNA	خطي
T_4	ملتهم بكتيري	1	174 kbp	dsDNA	خطي
Mycoplasma genetalium	بكتيريا حقيقية	1	580 Kbp	dsDNA	دائري
Borrelia burgdorferi	بكتيريا حقيقية	1	910 Kbp	dsDNA	خطي
Compylobacter jejuni	بكتيريا حقيقية	1	1.7 Mbp	dsDNA	دائري
Rhodobacrter sphaeroides	بكتيريا حقيقية	2	3.2 Mbp+0.9 Mbp	dsDNA	دائري2x
Bacillus subtilis	بكتيريا حقيقية	1	4.2 Mbp	dsDNA	دائري
Escherichia coli	بكتيريا حقيقية	1	4.6 Mbp	dsDNA	دائري
Streptomyces coelicolor	بكتيريا حقيقية	1	8.6 Mbp	dsDNA	خطي

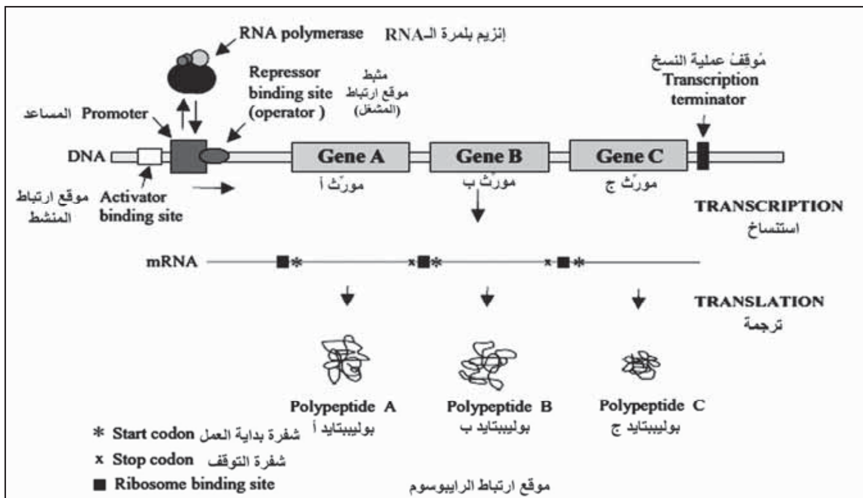
Myxococcus xanthus	بكتيريا حقيقية	1	9.45 Mbp	dsDNA	ND[أ]
Methannococcus jannaschii	أركيا	1	1.6 Mbp	dsDNA	دائري
Archaeoglobus fulgidus	أركيا	1	2.8 Mbp	dsDNA	دائري
Schizosaccharomyces pombe	كائن ذي نواة حقيقية eukaryote	3	3.5 إلى 5.7 Mbp إجمالي 18.8 Mbp	dsDNA	خطي
Sacchavromycos cererisiae	كائن ذي نواة حقيقية eukaryote	15	0.2 إلى 2.2 Mbp إجمالي 12.43 Mbp	dsDNA	خطي

(أ): ND: غير معروف. dsDNA: DNA ثنائي الجديلة. ssDNA: DNA أحادي الجديلة. bp: زوج قواعد وراثية. M: مليون. nt: نيوكليوتيد . k :1000

يُعتبر كروموسوم بكتيريا القولون *Escherichia.coli* نموذجاً للكروموسوم في عدة أنواع بكتيريا حقيقية. يبلغ وزنه 5 فيمتوغرام (Femtograms) أي $5x10^{-15}$ غرام، ويبلغ طوله 1100 ميكرومتر (μm) وعدد أزواج القواعد الوراثية فيه (4.6 Mbp) ويحمل شفرات وراثية لـــ4400 بروتين. ويحمل الكروموسوم طاقماً واحداً من الجينات (Single set of gene) ما عدا المورثات المسؤولة عن إنتاج الـــRNA الرايبوسومي Ribosomal).

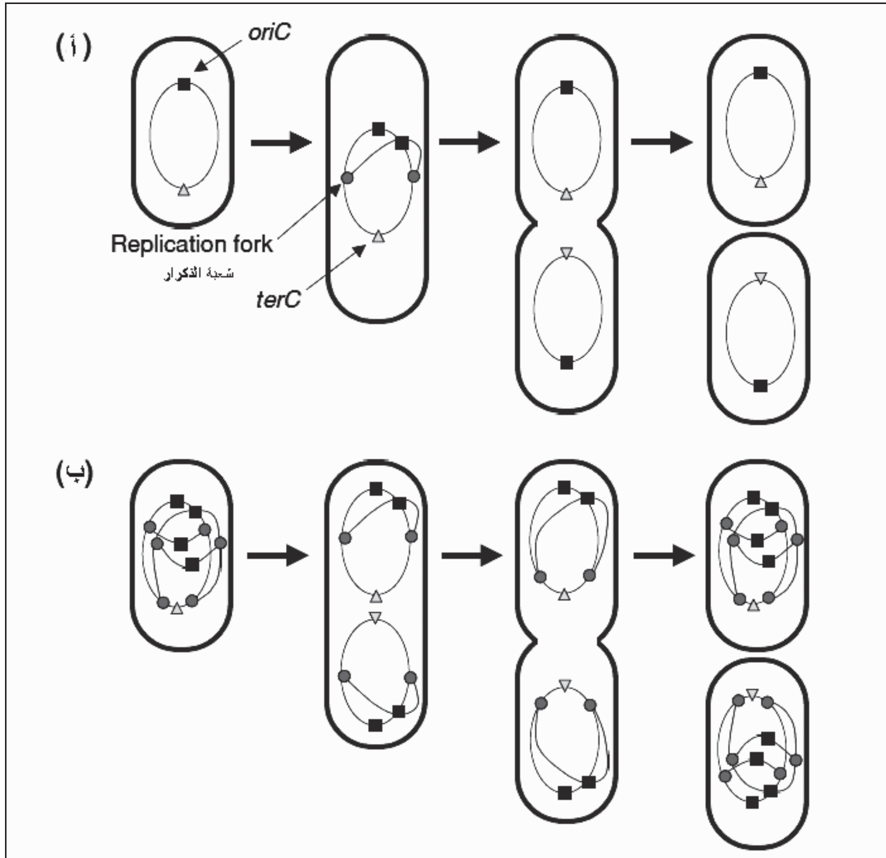
(RNAكما أن 90% من DNA يحمل شفرة للبروتين/ والببتيدات المتعددة (Polypeptide)، أما الـــ10% الباقية فهي إما أن تلعب دوراً في تنظيم التعبير الجيني، أو أن تقوم بوظيفة هيكلية فقط (Structural function). وفي مُعظم الأحيان تكون الجينات المسؤولة عن وظائف مشتركة متجمعة مع بعضها البعض في مكان واحد على الكروموسوم. فيما تتواجد الشفرة المسؤولة عن إنتاج البروتين على جهتي أية جدلة (Strand) من جدلتي الـــ DNA، بالرغم من تفضيل الجدلة المُتَّجِهة بنفس الاتجاه الذي تتم فيه عملية التضاعف (Replication). ويتألف التعبير الجيني من عمليتين منظمتين ومتناسقتين بشكل فائق الدقة. الأولى وهي عملية نَسخ الـــDNA بواسطة أنزيم بلمرة RNA أو RNA بوليمراز (RNA

(polymerase ويُنتِج هذا الأنزيم RNA رسول (mRNA) من خلال نسخ جدلة من الــDNA. تُعتبر جزيئات الــRNA غير مستقرة وسريعة التكسر إذ يُقاس نصف العمر (Half life) بالدقائق، (نصف العمر هو الوقت اللازم لتحلُّل نصف كمية الــRNA). هذا وتقوم الرايبوسومات أثناء عملية نسخ الــRNA الرسول (الرايبوسومات عبارة عن مركبات بروتينية كبيرة مع أحماض نووية (Nucleoprotein complexes بالالتصاق بمواقع محددة على الــmRNA، تُسمى موقع ارتباط الرايبوسوم (Ribosome binding sites)، ثم يقوم الرايبوسوم بترجمة المعلومات المشفرة الموجودة إلى سلسلة من الأحماض الأمينية، أي ببتيدات متعددة خطية Linear polypeptide. ولكي تتمكن الخلايا البكتيرية من تنظيم التعبير الجيني، فإن الــDNA مُنظَّمٌ بشكل وحدات نسخ (Transcriptional units) أو أوبرونات (Operons)، تحوي كل واحدة على تسلسلات ضابطة خاصة (Control sequences)، كما تحتوي على نقاط تشير لبداية وتوقف عمليات النسخ والترجمة، كما في الشكل 1.4.



الشكل 1.4: شكل مبسط يبين أهم مكونات الأوبرون (operon) في البكتيريا. إن مواضع اتصال المنشط والمثبط هي مواضع تقوم بتنظيم تردد (frequency) ابتداء عملية النسخ (transcription initiation). وبالرغم من امكانية التعرف على شفرة الابتداء والتوقف وعلى موضع التصاق الريبوسوم على جزيء الــDNA، إلا أن تلك الشفرات لا تعمل إلا على مستوى الــRNA الرسول.

يتضاعف كروموسوم بكتيريا الـــ *E. coli* باتجاهين (Bidirectional mode) انطلاقاً من موقع بدء التضاعف (Origin of replication) أو oriC وحتى نهاية طرف الجدلة terC وذلك باستعمال أنزيم بلمرة DNA رقم III بشكل أساسي (انظر الشكل 2.4). إن سرعة التضاعف على درجة حرارة 37ºC تبلغ حوالى 800 قاعدة في الثانية. أي أن عملية مضاعفة كامل الكروموسوم تستغرق 40 دقيقة. وبما أن بكتيريا الـــE.coli تقوم بانقسام شطري (Binary fission) كل عشرين دقيقة عند توفُّر مواد ذات قيمة غذائية عالية، مُنتِجةً بذلك خليتين متشابهتين وبنفس الحجم، فلا بد للكروموسوم في الخلية الواحدة أن يتضاعف في شُعب متعددة ما يؤدي إلى التضاعف بوقت أقل (انظر الشكل 2.4).



الشكل 2.4: مضاعفة كروموسوم بكتيريا الـــ E. coli باتجاهين (bidirectional). تبدأ المضاعفة عند نقطة الانطلاق oriC وتنتهي عند نقطة التوقف terC. (أ) في الخلايا ذات النمو

البطيء (وقت المضاعفة 60 دقيقة) هناك شعبة للمُضاعفة (replication fork) واحدة على كل جهة من الكروموسوم، أي موضع تصنيع الــDNA. (ب) في الخلايا ذات النمو السريع (وقت المضاعفة 20 دقيقة) تبدأ دورة المضاعفة (replication round) التالية قبل انتهاء الأولى، لذلك فإن على كل جهة من الكروموسوم أكثر من شعبة للمُضاعفة (replication fork)، أي أكثر من موضع تصنيع الــDNA.

2.2.4 ميكانيكيات نقل الجينات Mechanisms of gene transfer

إن القدرة على هندسة تغير وراثي لصفات البكتيريا يرجع تاريخه إلى عام 1928، وذلك خلال تجارب العالم "فرد غريفيث" Fred Griffith الذي لاحظ اختلافاً في الصفات الظاهرية (خشنة أو ملساء) لمستعمرات بتكيريا ستربتوكوكس نيومونيا (Streptococcus pneumoniae). والبكتيريا ذات المستعمرة الملساء هي الوحيدة التي تُسبّب مرضاً في الفئران. والاختلاف في الصفات الظاهرية (Phenotypes) يعود إلى وجود كبسولة في البكتيريا الملساء فقط، تُصنَّع من مواد سكرية معقدة وتمكن البكتيريا من تحاشي رد فعل جهاز المناعة فتستطيع البكتيريا الملساء هذه أن تعيش داخل الحيوان وتسبب له المرض. لاحظ "غريفيث" أيضاً أن حقن الفأر بمزيج من البكتيريا الخشنة (بدون كبسولة Non encapsulated) مع بكتيريا ناعمة قُتِلت مسبقاً بالحرارة يؤدي إلى تحوُّل البكتيريا الخشنة إلى بكتيريا ملساء ويتسبب بعدوى مميتة في الحيوان. بعد ذلك بأربعة عشر عاماً (سنة 1944) تم تشخيص المواد الكيمياوية المسؤولة عن ظاهرة التحول في هذا النوع من البكتيريا وهي الــDNA، وذلك من قِبَل Avery و Macleod و McCarty. وبعد ذلك بتسعة أعوام تم في سنة 1953 اكتشاف تركيبة الــDNA وبنيته الهيكلية من قِبل "واطسون" و"كريك" (Watson & Crick). إن الميكانيكية التي يتم بها انتقال الــDNA أو جزء منه إلى بكتيريا أخرى لا يزال يُعرف بالتحويل أو التحوير(Transformation) نسبة إلى تحويل بكتيريا نيومونيا في تجارب "غريفيث". تسمى الخلايا التي تلقَّت الــDNA بالمتحوِّلة (Transformant). تتم عملية التحويل الوراثي من خلال انتقال الــDNA في أجناس (Bacterial genera) عديدة من البكتيريا نذكر منها Azotobacter، Bacillus، Compylobacter، Clostridium، Haemophilus، Mycobacterium،

Neisseria، Streptococcus وStreptomyces. إضافة إلى تلك الأجناس هناك سلالات (Strains) كثيرة ليس من طبيعتها التحويل، ولكن من الممكن تحويلها وجعلها تستقبل DNA من الخارج بعد معالجتها بمواد كيميائية أو تعريضها إلى حقل كهربائي (انظر الفقرة 5.4.4).

بعد اكتشاف "غريفيث"، تم التعرف على آليتين إضافيتين لانتقال DNA بين سلالات البكتيريا وهما: النقل أو التحويل بواسطة التنبيغ (Transduction)، والاقتران (Conjugation). أما النقل بواسطة التنبيغ فهو نقل DNA من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلة بمساعدة فيروس بكتيري يعرف باسم ملتهم بكتيري (Bacteriophage) وتبسيطاً "باسم مُلْتَهم". وقد قام كل من "زندر" و"ليدربيرغ" (Zinder وLederberg) في عام 1952 ببرهنة هذه العملية من خلال تجارب على بكتيريا سلمونيلا *(Salmonella)* وباستعمال ملتهم P22. فقد وجدوا أنه أثناء مرحلة مضاعفة الـــDNA الفيروسي في الخلية المُعطية، فإن جزيئات الملتهم الصغيرة التي تسمى "فيريون" (Virions) تقوم بتغليف جزء من DNA البكتيريا عوضاً عن DNA الملتهم. فيصبح ذلك الفيروس جُسيماً مُنبِّغاً (Transducing particles) أي واسطة للنقل، ويحتفظ بالقدرة على الإمراض بحيث يحقن DNA من كروموسوم الخلية المُعطية (بدلاً من DNA الفيروس) في خلية السلالة المُستقبِلة (Host cell) . إن الخلية المستقبلة للـــDNA الذي يسبب التحويل يطلق عليها اسم المُنبَّغ (Transductant).

أما الميكانيكية الثالثة لنقل الجينات فهي الاقتران (Conjugation) كما ذكرنا، التي تم اكتشافها سنة 1946 من قِبَل "ليدربيرغ" و "تاتوم" (Lederberg وTatum)، وتقتضي اتصالاً مباشراً بين خلية وأخرى. يعتمد الاقتران على مواد وراثية خارجة عن الكروموسوم (Extrachromosomal) تسمى بلازميد (Plasmids). و البلازميد هو جديلة ثنائية من dsDNA ذي شكل دائري مغلق بروابط تساهمية Covalent، وللبلازميد القدرة على التضاعف بشكل مستقل عن كروموسوم الخلية المُضيفة، بالرغم من إمكانية الالتحام بينهما أحياناً. البلازميد هو

من مميزات سلالات البكتيريا بشكل عام، وتضفي على الخلية خصائص كثيرة ومتنوعة ولكنها غير ضرورية، ومنها صفات المقاومة لمضادات الحيوية Antibiotic resistance، وإنتاج مواد سامة (Toxin)، والتسبب بأورام للنباتات، وتحليل مركبات الهيدروكربون والمواد العطرية (aromatic) مثلاً الكافور (Camphor) والنافثالين (Naphthalene)، والساليسيليت (Salicylate)، والخصوبة. ويتراوح حجم البلازميد بين 1 إلى 150 kbp. هناك بعض البلازميدات العملاقة (Mega-plasmids) التي يزيد حجمها على 150 kb في سلالات من أجناس بكتيريا مختلفة مثل الــ *Agrobacterium*، والــ *Pseudomonas*، والــ *Streptomyces*. وقد يشكل البلازميد من 1 إلى 4% من هوية المضيف الجينية (Host Genotype)، وفي حالات نادره قد تصل النسبة إلى 20%. إن بلازميد F في بكتيريا الــE. coli يُضفي الخصوبة على الخلية المُضيفة، لذلك يسمى بلازميد الاقتران (Conjugative plasmid).

يقتضي اقتران البكتيريا عملية انتقال الــDNA من الخلية الواهبة إلى المُستقبِلة، وفي معظم الأحيان يكون الــDNA المنقول هو البلازميد، ونادراً ما يكون قطعة من DNA الكروموسوم في الخلية الواهبة. أما الآلية المتخصصة للنقل والأدوات المُستعملة، فإن شفرتها الوراثية موجودة على بلازميد الاقتران، ما عدا الأنزيم المسؤول عن التضاعف الذي توجد شفرته على الكروموسوم. إن الــDNA المنقول غالباً ما يكون ذا جدلة واحدة خلال عملية النقل، أما الجدلة المُكمِّلة فإنها تُصنَّع عادةً في الخلية المُستقبِلة بعد إتمام عملية الانتقال. ويندر انتقال الجينات من الكروموسوم بينما يلاحظ أن انتقال البلازميد هو الأكثر حدوثاً، ولكن بعض البلازميدات قد تساهم في نقل جينات من الكروموسوم بتردد عال قد يصل إلى قيمة 1 (أي بنفس تردد عملية انتقال البلازميد)، ويسمى هذا النوع من بكتيريا *E. coli* ذي التردد العالي بــHfr اختصاراً لــHigh frequency .

ثمة أعداد من البلازميدات الصغيرة القادرة على الانتقال بطريقة الاقتران، على الرغم من أنها لا تحمل بذاتها الشفرة المسؤولة عن وظيفة الخصوبة. وهذه

البلازميدات تدعى البلازميدات المُحرَّكَة Mobilisable plasmids، فهي تستغل صفة الخصوبة عندما تتواجد مع بلازميدات الاقتران في نفس الخلية. تحتوي البلازميدات على موقع للانتقال (Origin of transfer أو OriT) وجينات التحريك (mobilization genes أو mob) التي تُشفِّر البروتينات المسؤولة عن عملية التضاعف والانتقال. وعندما يستعمل بلازميد من هذا النوع بصفة ناقل (Cloning vector) خلال عملية انتساخ أو كلونة الــDNA، فإنه يتم حذف جينات mob كتدبير احترازي لتفادي انتشار الجين المنسوخ بشكل غير مسيطر عليه إلى الكائنات الحية البرية في الطبيعة.

بالرغم من كون الانتقال بالاقتران (Conjugation) هو الطريقة الأكثر شيوعاً بين البكتيريا، إلا أن الانتقال بين البكتيريا والفطريات، وأيضاً بين البكتيريا والنباتات قد تم اكتشافه وبرهنته. حيث إن سلاله أغروبكتيريا (Agrobacterium tumefaciens) التي تحتوي على بلازميد (طوله أكثر من 200 kb) يُحفز على تكوين الورم، واختصاراً يسمى (Ti plasmid)، يمتلك هذا البلازميد قدرة على نقل بعض أجزائه، بالتحديد T-DNA (طوله من 20 إلى 30 kbp)، إلى الخلية النباتية حيث تتداخل هذه القطع مع جينوم الخلية النباتية في النواة. ويتم هذا الانتقال بمساهمة جينات مُمْرِضة (Virulence genes) واختصاراً (Vir. genes) التي تتشابه مع جينات البكتيريا المسؤولة عن نظام الاقتران (Bacterial conjugative system). لقد تم تطويع وملاءمة البلازميد Ti من البكتيريا Agrobacter بهدف إدخال صفات جديدة على النباتات (النباتات المعدلة وراثيا Transgenic plants)، كمقاومة النبات للآفات والحشرات (انظر الفصل الثالث والعشرين).

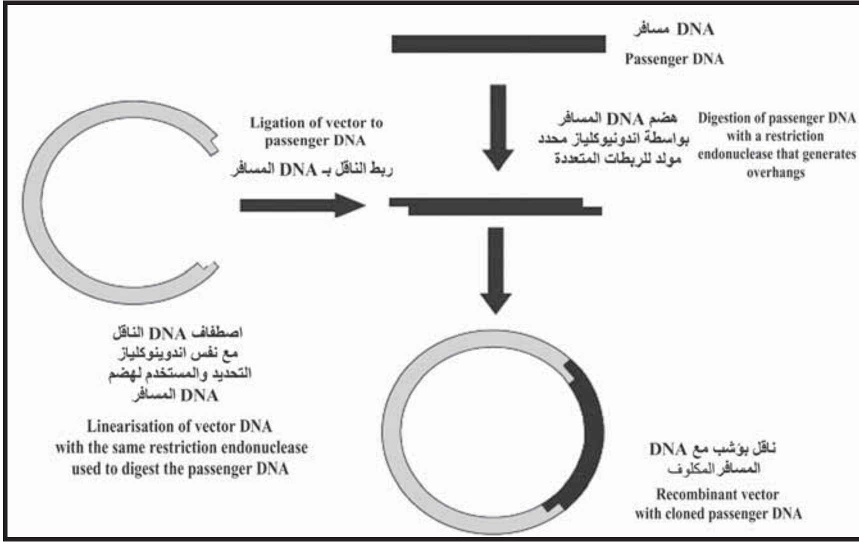
لقد ساهمت طرق نقل الجين، بالأساليب الطبيعية، برسم الخريطة الجينية لأنواع مختلفة من البكتيريا، وبينت الخريطة ترتيب الجينات المتنوعة وحددت المسافات التقريبية بينها. إن تلك الوسائل الكلتاسيكية لرسم الخرائط الوراثية، التي تم تطويرها بشكل ملموس في عدد محدود من أنواع البكتيريا، فسحت المجال لتحليل تفصيلي لهيكلية الجين وعملية ضبط وتنظيم التعبير الجيني. وتتيح تلك

الطرق بناء سلالات تحمل خصائص جديدة تتناسب مع استعمالات التقانات الحديثة في الهندسة الوراثية.

3.4 ما هي الهندسة الوراثية، وما هي مجالات استعمالها؟

What is Genetic Engineering and What Is It Used For?

لقد توقع العلماء في منتصف الستينيات من القرن الماضي أن يصبح تحليل الـــDNA والتلاعب به ممكناً بواسطة وسائل وأدوات الهندسة الوراثية (تقانة الـــDNA المأشوب)، وفي منتصف السبعينيات بدأت تلك التوقعات تثمر. لقد نشأت تلك التقانة وتطورت بسرعة كبيرة، ولا تزال. لقد نشأت من دراسات أساسية في مجالات علمية مترابطة ومتداخلة، هي الكيمياء الحيوية وعلم الوراثة للكائنات الجرثومية. ومن أهم المفاتيح لهذا العلم اكتشاف أنزيمات حصرية (Restriction) وأنزيمات التغيير (modification) عند البكتيريا من قِبل "فيرنر أربر" Werner Arber، مما وفّر أنزيمات قادرة على قطع الـــDNA في مواقع مُحدَّدة (Target sites). تُعرف هذه الأنزيمات باسم اندونيوكلياز حصري (Restriction endonucleases) أو تبسيطاً أنزيمات حصرية (Restriction enzymes). ولقد استُغِلَّت تلك الأنزيمات سريعاً في تحوير وتحليل الـــDNA من مصادر مختلفة. بعد تلك البداية المتواضعة، تم تطوير عدد من التقانات لتحوير وتحليل الـــDNA والـــRNA بشكل أدق وأكثر فعالية خاصة بعد تطوير تقانات أساسية مثل سَلسَلَة الـــDNA (DNA sequencing) والتصنيع الكيميائي لسلاسل نيوكليوتايد قصيرة، أوليغونيوكليوتيد (Oligonucleotide)، وتفاعل البلمرة المتسلسل الـــPCR (polymerase chain reaction). في نفس الفترة الزمنية، ساهم في تطور وتسهيل تلك التقانة توفُّر كميات كبيرة من المواد الكيميائية والكواشف (Reagent) والمعدات على مستوى صناعي بقيمة تتجاوز ملايين الدولارات.



الشكل 3.4: مُخطط بياني للمبدأ الأساسي في الهندسة الوراثية باستعمال ناقل (vector) و DNA راكب أو منقول (passenger).

لقد أدى قدوم تقانة الـــDNA المأشوب إلى إمكانية تحليل الـــDNA بدقة عالية لم يكن أحد يتخيلها قبل ذلك ببضع سنين فقط، وأدى بالتالي إلى إمكانية تحوير جينوم أي كائن حي (سواء كان بدائي النواة، أو أركيا، أو حقيقي النواة) لإنتاج مواد حيوية، والتي لم تكن تُنتج سابقاً إلا في الخلايا الأصل. لقد سمحت هذه التقانة (المبينة في الشكل 3.4) بإنتاج بعض البروتينات بكم ونوع غير مسبوقين ولم يتم التوصل إليهما من قبل (انظر الفصل الحادي والعشرون)، كما سمحت أيضاً بإنتاج مركبات مُعدلة جذرياً أو جديدة كلياً وذات نشاط حيوي (Bioactive). ولقد طُبِّقت تلك التقانة في مجالات عديدة صناعية وصيدلانية حيث تهدف بشكل رئيسي إلى إنتاج مركبات طبيعية ذات قيمة علاجية محققة أو ممكنة وإنتاج مركبات لا تتواجد في الطبيعة من قبل.

4.4 الوسائل والأدوات الأساسية في الهندسة الوراثية

Basic tools of genetic engineering

إن تقانات عزل (استخلاص)، وقطع ولصق جزئيات الـــDNA التي تم تطويرها في بداية السبعينيات، شكلت الأسس التي بُنيت عليها تقانة الهندسة

الوراثية وتحليل الأحماض النووية. فقد أصبح بالإمكان انتساخ أي قطعة DNA من أي كائن حي وإدخالها إلى بكتيريا من خلال وضعها في ناقل (Vector) يتم إدخاله للبكتيريا حيث يثبت ويُحافظ عليه.

1.4.4 إستخلاص وعزل الحمض النووي

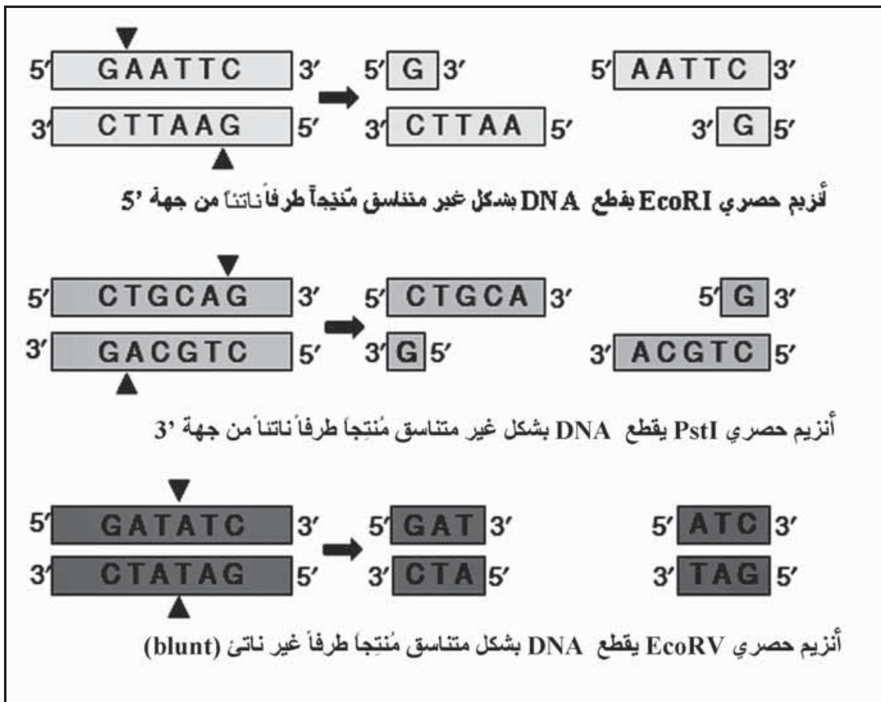
Isolation and purification of nucleic acids

لا بد للتقانة الجينية في الزجاج (in vitro) من الاعتماد على تقانات الكيمياء الحيوية للحصول على كمية كبيرة ونقية من الحمض النووي من الخلايا الجرثومية. والخطوة الأولى لعزل الحمض النووي هي عملية تكسير الخلايا بطرق ميكانيكية أو أنزيمية، وذلك بهدف إخراج المحتوى الذي يتضمن الأحماض النووية. في المرحلة الثانية يتم فصل الأحماض النووية عن المكونات الأخرى في الخلية، كالبروتين والكربوهيدرات المعقد كي نحصل على أحماض نوويه ذات نقاوة مناسبة تسمح لأنزيمات تحوير الحمض النووي بالعمل. تُستخلص الأحماض النووية وتُجمع بواسطة عدة خطوات تنقيه تشمل جهاز الطرد المركزي (Centrifuge)، والرحلان الكهربائي (Electrophoresis)، ومن ثم الالتصاق (Adsorption) على سطح خامل (Inert) غير قابل للذيبان (Insoluble)، أو عبر عملية ترسيب باستعمال مذيب غير مائي (Non-aqueous solvents).

2.4.4 قَطْعِ جزيئات DNA — Cutting DNA Molecules

تُشكِّل إمكانية قطع الـــDNA في مواضع محددة أو بشكل عشوائي إحدى الضرورات للعديد من تقانات الـــDNA المأشوب. ويمكن قطع الـــDNA بواسطة أنزيمات أو بطريقة ميكانيكية. عملية القطع الميكانيكي تتم بشكل غير محدد وتُنتِج قطعاً مختلفة من الـــDNA ذات طول عشوائي يستفاد منها عند تحضير مكتبات جينية (Genomic libraries) كما سيرد ذكره في الفقرة 5.4.4. عند استعمال هذه الطريقة الميكانيكية يصبح من الصعب عزل قطعة معينة تحتوي على مورث محدد أو على أوبرون (Operon). وعلى العكس، يمكن عزل قطعة

DNA محددة تحمل المورث المطلوب عند قطع الــDNA بالأنزيمات الحصرية (Restriction enzymes) التي تقطع تسلسلاً معيناً في مواقع محددة على كلتا الجديلتين من dsDNA. إن الأنزيمات الحصرية تقطع العمود الفقري للــDNA وهو الفوسفات ثنائي الإيستر (Phosphodiester)، يؤدي القطع إلى إنتاج طرفين لكل جديلة وهما 3´OH و $5´PO_4$. لقد تم استخلاص وعزل بضع مئات من الأنزيمات الحصرية من أنواع مختلفة من الكائنات الجرثومية. وتم تصنيف تلك الأنزيمات الحصرية إلى أنواع ذات خصائص كيميائية حيوية مختلفة؛ ويُعد النوع الثاني (type II) الأكثر استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية.



الشكل 4.4: القطع الحصري للــDNA على موقع محدد بواسطة إندونيكليايز. يُنتِج القطع أطرافاً 3´ و 5´ قد تكون ناتئة (overhangs) أو غير ناتئة (blunt).

إن تسميه الأنزيمات الحصرية تعتمد على نوع الخلية التي تم استخلاصه وعزله منها. فمثلاً الأنزيم المُستخلص من بكتيريا هيموفيلس إنفلونزا Haemophilus influenza يدعى Hin وذلك المعزول من عصيات Bacillus

amyloligrefaciens يُدعى Bam، ... الخ. وإذا تم عزل أكثر من نوع أنزيم من سلالة واحدة أو نوع واحد، عندها تضاف الأرقام الرومانية بعد الاسم، على سبيل المثال HindI HindII وHindIII وهي أنزيمات معزولة من Haemophilus influenza ومن سلالة Rd بالتحديد.

إن تسلسل القواعد النووية في الموقع الذي يتعرف عليه الأنزيم الحصري (الموقع الحصري للقطع Restriction site) للنوع الثاني من الأنزيمات الحصرية (type II) هو قصير في معظم الحالات يتراوح بين 4 و 6 أزواج من القواعد. يلعب طول الموقع الحصري وتركيبته من النيوكليوتيدات (أي نسبة أزواج القواعد GC و AT)، والمقارنة بتركيبة بقية الـــDNA، دوراً لتحديد عدد مرات القطع أو "تردد القطع". على سبيل المثال، في جزيء DNA مُكوَّن عشوائياً وبنفس التردد من القواعد نيوكليوتيدية الأربع، في هكذا جزيء سيكون احتمال واحد لوجود تسلسل معين من أربعة قواعد في كل 256 bp أي (4^4)، وذلك كمعدل عام. بينما إذا بحثنا عن تسلسل من ستة قواعد فسيكون احتمال وجوده (بالمعدل) مرة واحدة كل 4096 bp (4^6).

في معظم الأحيان يتميز الموقع الحصري بنقطة تماثل، فهو متماثل ويسمى باليندرومك Palindromic (التسلسل معكوس يُقرأ بنفس الطريقة على الجدلتين)، أي إن التسلسل نفسه يُقرأ على كلتا الجديلتين في الـــDNA (الشكل 4.4). يتم قطع الموقع الحصري وإنتاج أطراف غير ناتئة (Blunt) أو ناتئة (Overhang) حيث تبقى الأطراف المتراكبة القابلة للالتصاق (Cohesive) أحادية الجدلة (الشكل 4.4). يبيّن الجدول 3.4 عدداً من الأنزيمات الشائعة الاستعمال ومواقع قطعها الحصرية.

3.4.4 لصق قطع الـــ DNA Joining DNA fragments

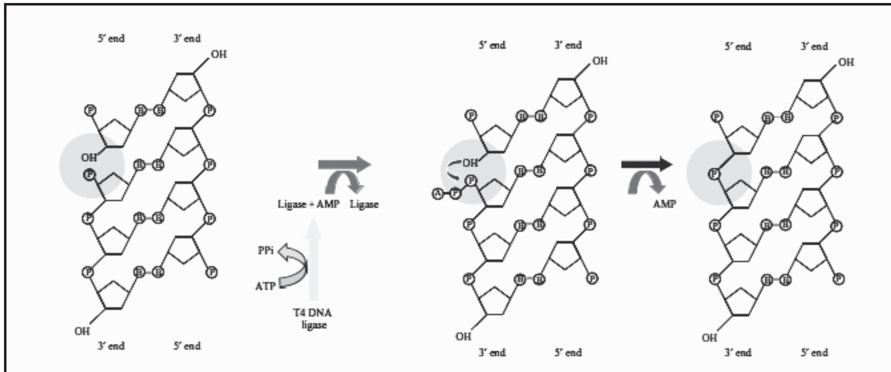
يمكن لصق قِطَع DNA ذات النهايات الناتئة والمتراكبة (Cohesive)، وأيضاً تلك غير الناتئة (Blunt). تتم هذه العملية مخبرياً في الزجاج (In vitro)، وذلك بمساعدة أنزيم لصق الـــDNA (DNA ligase). يُسهل هذا الأنزيم تكوين رابطة الفوسفات ثنائي الإيستر (Phosphodiester) بين مجموعة 3’OH على

طرف جدلة أولى ومجموعة $5'PO_4$ على طرف الجدلة الثانية. ويُستعمل أنزيم لصق الـــDNA (ligase) المُستخرج من الملتهم البكتيري T4 (T_4 phage) بشكل شائع للصق النهايات الناتئة وغير الناتئة (Blunt and cohesive ends). يحتاج أنزيم لصق الـــT4 DNA لعامل مساعد (Co-factor) هو الـــATP لكي يعمل، حيث يتم تنشيط الأنزيم من خلال ارتباطه مع الـــAMP لإنتاج مركب وسطي (Enzyme-AMP intermediary complex) الذي يلتحم بعدها بالأطراف $3'OH$ و $5'PO_4$ على نهايتي جدلتي الـــDNA، فيصنع رابط تساهمي (Covalent) من الفوسفات ثنائي الإيستر (Phosphodiester) كما في الشكل (5.4).

الجدول 3.4: بعض الأنزيمات الحصرية (restriction endonucleases) الشائعة الاستعمال والمواقع الحصرية التي تَعمل عليها. القواعد النيوكليوتيدية الموضوعة داخل أقواس تدل على إمكانية اختلاف في تسلسل الموقع الحصري. تمت كتابة التسلسل لجديلة واحدة باتجاه ´5 إلى ´3 (من اليسار إلى اليمين). أشير إلى نطقة القطع بعلامة السهم

الأنزيم	المصدر	الموقع الحصري
BamHI	*Bacillus Amyloliquifaciens H*	GATCC ↓G
EcoRI	*Escherichia coli RY13*	AATTC ↓G
EcoRII	*Escherichia coli R245*	CC(T/A)GG↓
HaeIII	*Haemophilus egyptius*	GG↓CC
HindIII	*Haemophilus influenza Rd*	A↓AGCTT
KpnI	*Klebsiella pneumoniae*	GGTAC↓C
NotI	*Nocardia otitidis-caviarum*	GC↓GGCCGC
PstI	*Piovidencia Stuartii*	CTGCA↓G
Sau3A	*Staphylococcus aureus 3A*	↓GATC
SmaI	*Serratia marcescens*	CCC↓GGG

تشمل عملية اللصق عادة قطعة الـــDNA المنقوله (Passenger) وجزيء الناقل (Vector) (الشكل 3.4). وبهدف رفع احتمال الالتحام بين جزيئات DNA للناقل والمنقول (بدون التحام بين جزيئات الناقل بعضها مع بعض وبدون انغلاق الجزيء الناقل على نفسه) يتم اعتماد التركيز المولي (لا تركيز الكتلة) بنسبة مول واحد من الناقل إلى 10 مول من المنقول. ويمكن أيضاً رفع ذلك الاحتمال إذا أزيلت مجموعة الفوسفات من طرفي '5 للـــDNA الناقل (في هيئته الخطية linearised)، وذلك بمساعدة أنزيم قطع الفوسفات (Phosphatase) المُستَخرَج من أمعاء العجول (CIP أو calf intestinal phosphatase). بما أن مجموعة الفوسفات (التي أزيلت) ضرورية لالتحام طرفي الناقل مع بعضهما البعض، يستحيل إعادة لصق نهايتي الناقل مع بعضهما البعض وإرجاعه إلى شكله الدائري (Recircularisation). وعليه فإن إزالة الفوسفات من الـــDNA الناقل تزيد من فرصه التحام الـــDNA المنقول معه، ذلك لأن هذا الأخير لا يزال يمتلك مجموعة فوسفات على طرفي ´5، فسيكون الـــDNA المنقول مصدر الفوسفات الضروري لعملية اللصق. تُنتِج هذه العملية جزيئات من الـــDNA الناقل ثنائية الجدلة ودائرية، زُرع فيها الـــDNA المنقول، وتحتوي كل جدلة على فجوة واحدة. وتُعدُّ تلك الجزيئات ثابتة بما يكفي لإدخالها، بعملية تحويل (Transformation)، إلى خلية انتساخ مُستقبِلة حيث يتم إصلاح الفجوتين المتبقيتين.

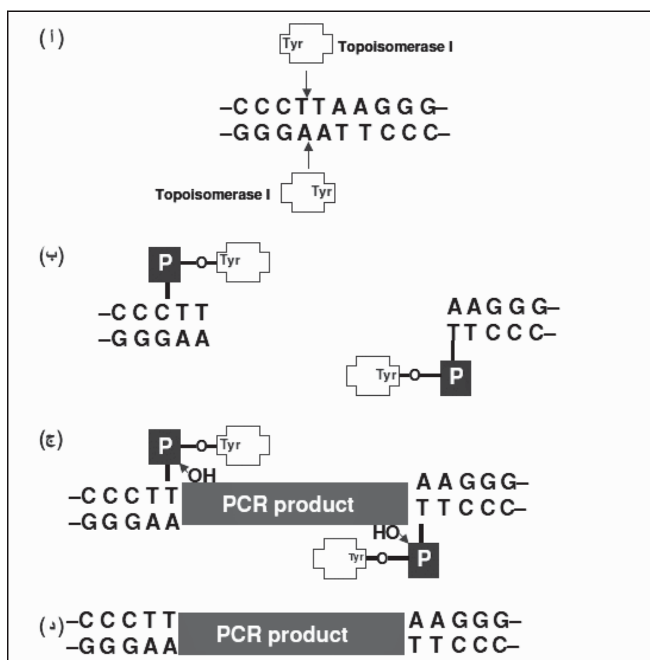


الشكل 5.4: النشاط المسرِّع لأنزيم لاصق الـــDNA (DNA ligase) من ملتهم بكتيري T4. يجتمع الأنزيم مع الـــAMP ثم يلتصقان بالأطراف المقطوعة في هيكل الفوسفات ثنائي الإيستر في الـــDNA، ويقوم الأنزيم بإنشاء رابط تساهمي (covalent) بين أطراف ´3OH و ´5PO$_4$ على جهتي القطع.

إن تفاعل اللصق بمساعدة أنزيم لصق الــDNA من T4 (T4 DNA ligase) هو ذو فعالية محدودة نسبياً (حوالى 60%) ويستغرق وقتاً طويلاً من 2 إلى 12 ساعة، خاصة عندما تكون أطراف الــDNA المراد لصقه غير ناتئة (blunt). في السنوات الأخيرة تم إدخال تقانات جديدة بهدف تحسين كفاءة تفاعل اللصق.

على سبيل المثال، هناك استخدام أنزيم توبويزمرايز I (Topoisomerase I) المستخرج من فيروس الفاكسينيا *(Vaccinia virus)*، الذي يقوم بدور أنزيم قطع حصري وأنزيم لصق بنفس الوقت (الشكل 6.4). يعمل هذا الأنزيم في الطبيعة على تحرير توتر الحلزنة والتفاف الــDNA على بعضه البعض (Supercoiling)، ويتميز بقدرته على تمييز التسلسل الخماسي 5´(C/T)CCTT3´ وقَطع جديلة واحدة فقط بعد هذا التسلسل مباشرة ما يسمح للــDNA بالتخلص من الالتفافات الزائدة. وتعمل الطاقة المتحررة من عملية القطع هذه في تكوين رابط فوسفوتايروسيل (Phosphotyrosyl) تساهمي (Covalent) بين الحمض الأميني تايروسين (Tyr) في الموقع 274 من سلسلة الأنزيم وطرف جدلة الــDNA $3'PO_4$ الناتج من القطع. ثم يقوم طرف الجدلة الآخر 5´OH بعكس التفاعل من خلال مهاجمة رابط فوسفوتايروسيل على DNA الناقل ما يؤدي إلى تفاعل لصق ذي كفاءة عالية.

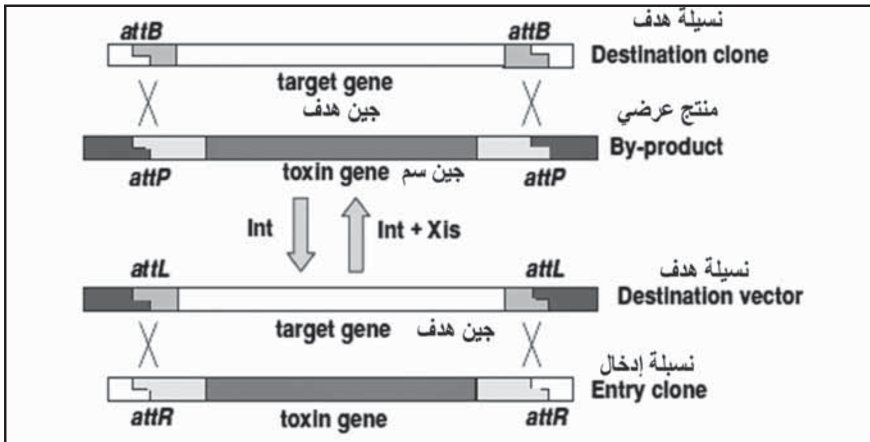
هناك منتج متوفر تجارياً لأنزيم فاكسينا توبوايزومرايز I (Vaccinia topoisomerase I) متصلاً برابط تساهمي مع طرفي 3´ للــDNA الناقل الخطي (linear)، وتبلغ كفاءة هذا المنتوج لجهة اللصق 95% عند استعمال DNA ذي أطراف غير ناتئة أو منتَج PCR ذي أطراف ناتئة من الأدينوزين (Adenosine) على جهة 3´ (ناتجة من عمل أنزيمات تفتقد قدرة القراءة التصحيحة مثل أنزيم بلمرة الــTaq DNA "تاك DNA بوليمراز").



الشكل 6.4 : أنزيم توبوإيزومرايز I من فيروس الفاكسينيا Vaccinia virus يقوم بنشاط القطع واللصق في نفس الوقت، فيمكن استعماله خلال انتساخ قِطع من الـــDNA (DNA Cloning). في الشكل (أ) يتعرف الأنزيم على التسلسل ´5'CCCTT3 . في الشكل (ب) يقطع الأنزيم عند نهاية التسلسل الذي تَعرَّف عليه مباشرة. في هذا المثال يتعرف الأنزيم على التسلسل الموجود على كلتا الجديلتين، لذلك فإنه يقطعهما معاً على مواضع متعاكسة. ويبقى الأنزيم موصولاً برابط تساهمي مع منطقة القطع في الـــDNA وذلك من خلال التايروسين الواقع في موضع 274 من سلسلة الأحماض الأمينية. في الشكل (ج) تتم مهاجمة رابط الفوسفوتايروسيل من قِبل مجموعة الـــ´5OH من الـــDNA قيد اللصق (وهو مُنتَج PCR باستخدام بادئ تفاعل (primer) لا يحتوي على فوسفات على الطرف ´5، . في الشكل (د) لصق منتج الـــPCR مع DNA الناقل برابط فوسفات ثنائي الإيستر (phosphodiester) بين مجموعة الـــ$3´PO_4$ (على طرفي الناقل) والـــ´5OH (على طرفي منتَج الـــPCR).

هناك طرق أخرى جديدة قد تم تطويرها لزيادة كفاءة الالتصاق خلال عملية تحويل الـــDNA المنقول من ناقل أول إلى إلى ناقل ثان. إحدى هذه التقانات تعتمد على مميزات ميكانيكية في عملية استئصال ودمج تتم في موضع محدد (Site-specific integration/excision) التي توجد طبيعياً عند الملتهم البكتيري λ. فعندما يصيب الملتهم λ بكتيريا *E. coli* فإنه إما أن يدخل في حلقة انحلالية (Lytic cycle) ينتج منها ولادة 200 نسخة من الملتهم، والتي تتم على

حساب الخلية المضيفة، وإما أن يدخل في سبات أو حلقة مُنشِئة للإنحلال (Lysogenic cycle) حيث يتحد فيها DNA الملتهم (Phage) مع الكروموسوم البكتيري في موقع خاص يسمى att. تتم عملية الدمج بمساعدة أنزيم الاندماج أو انتغرايز (Integrase) أو Int، الذي يُفرِزه الملتهم نفسه، ومن خلال تقاطع (عبور) في مواقع محددة (Site-specific cross-over) بين كل من موقع attB على كروموسوم البكتيريا مع الــattP على DNA الملتهم، فنحصل بذلك على attL وattR في موقع ارتباط جينوم البكتيريا مع DNA الملتهم. إن هذا التفاعل منعكس (Reversible)، ولكن انعكاسه يتطلب عملاً مشتركاً بين كل من أنزيم الاندماج Int وأنزيم استئصال Xis تكمُن شفرته في DNA الملتهم. عندما تستخدم هذه الطريقة لنقل الــDNA بين الملتهم والخلايا المختلفة فإن الــDNA المستهدف (Target DNA) يتم دمجه بين موقعي att للملتهم λ كما يبين الشكل 7.4 (attB x attP ↔ attL x attR). إن تحريك التفاعل باتجاه محدد يعتمد على إضافة إما Int أو Xis + Int وكذلك على المنتجات وتناسبها مع خلية *E-coli* المضيفة. ثم يتم انتقاء البلازميد المقصود والذي يحمل الــDNA المستهدف والمطلوب من خلال صفة المقاومة لمضاد حيوية معين. ولتفادي انتقاء البلازميد المقصود الأساسي (قبل دمج DNA المستهدف معه) فإن التسلسل الموضوع بين مواقع att هو جين فتاك يعطي سماً قاتلاً لبكتيريا *E. coli*.



الشكل 7.4: يمكن نقل الـDNA المنتسخ بين نواقل مختلفة بدون الحاجة إلى الانتساخ الثانوي التقليدي (sub-cloning). يعتمد هذا النظام على التأشيب في موقع محدد (site-specific

recombination) الذي يقوم به فايج λ. يتم أولاً انتساخ الـDNA المستهدف بوضعه في الناقل "المدخل" (entry vector) لإنتاج النسيلة "المدخل" (entry clone). يمزج هذا الأخير مع الناقل المقصود (destination vector) ومزيج من أنزيمات التأشيب Int و Xis (Int and Xis recombinases) فيحصل التحام ذو كفاءة عالية وباتجاه واحد (unidrectional) لإنتاج الــDNA المنتسخ المقصود مع نواتج عرضية. بعد نقل هذا الأخير إلى خلية مضيفة حساسة للسم الناتج من الجين المسم (toxin gene)، يتم انتقاء الـDNA المنتسخ المقصود بناء على قدرته على مقاومة المضاد الحيوي. يكون التفاعل معكوساً في حالة إضافة الأنزيم Int فقط لخليط التفاعل، عندها تنعكس أدوار كل النواقل المستعملة في التفاعل.

4.4.4 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) واستعمالاته

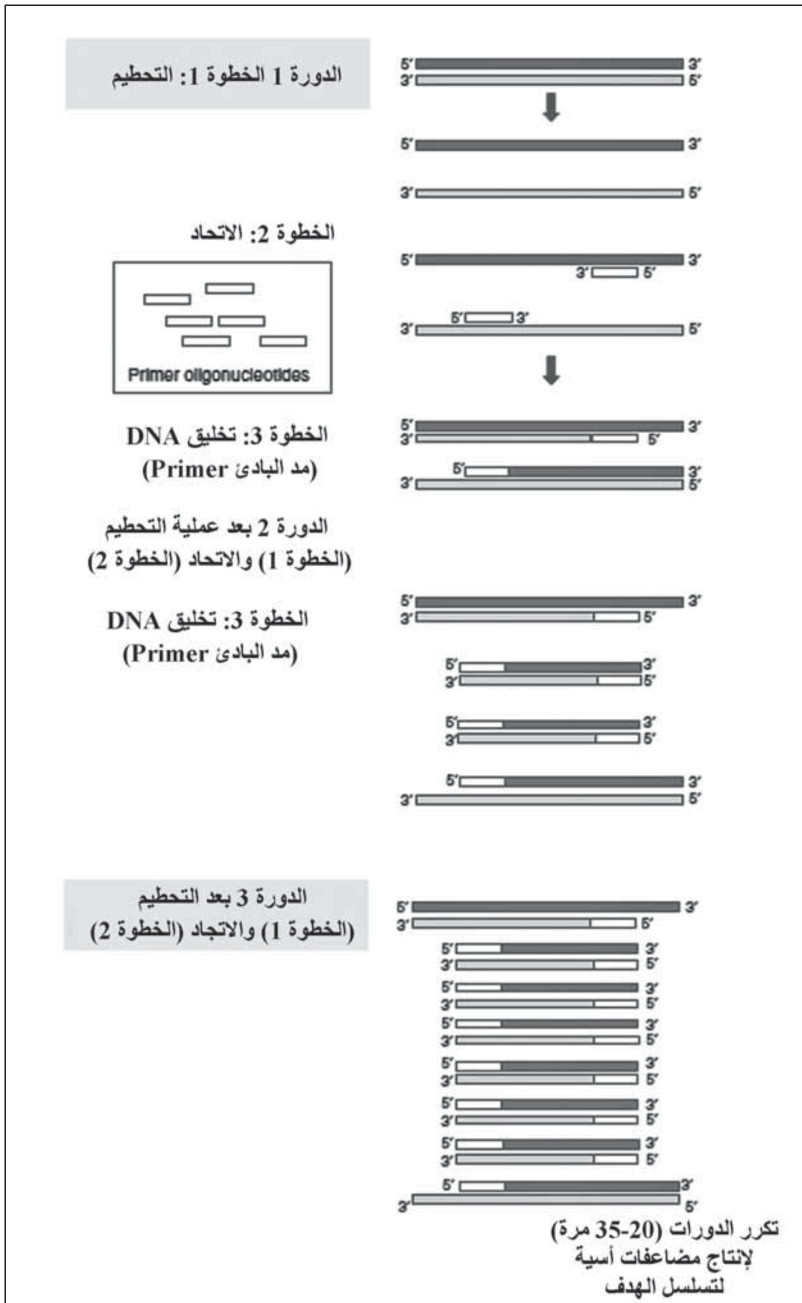
The polymerase chain reaction (PCR) and its uses

لقد كان لتقانة الــPCR منذ العام 1980 ولغاية الآن التأثير الكبير في تطوير تقانة تأشيب الــDNA (Recombinant DNA Technology). فبواسطته نستطيع تضخيم ومضاعفة (Amplification) أي قطعة DNA محددة يتراوح طولها بين 0.2 و40 kbp. بما أن تفاعل الــPCR هو دائري يضاعف تركيز الــDNA مع كل دورة، فإن الكمية النهائية من مُنتج المضاعفة تزداد بشكل مطَّرِد. نظرياً يكون محصول المضاعفة، انطلاقاً من نسخة قالب (Template) واحدة، 10^6 نسخة مع انتهاء الدورة العشرين و10^9 مع انتهاء الدورة الثلاثين. يحتاج التفاعل خلال الــPCR إلى أنزيم بلمرة DNA ذي ثبات حراري (Thermostable DNA Polymerase)، وإلى DNA النموذج أو القالب (Template) المراد مضاعفته، وإلى زوج محدد من أوليغونيوكليوتايد بادئ التفاعل (Primer oligonucleotides)، وإلى المواد الأولية للتفاعل وهي الأنواع الأربع من نيوكليوتايد الثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسيجين (Deoxynucleotide triphosphates) وهي dATP و dCTP وdGTP و dTTP.

يصنع زوج أوليغونيوكليوتيد بادئ التفاعل (بطول حوالى 20 نيوكليوتيد) بطريقة كيميائية بحيث يكون تسلسل القواعد فيهما متمماً (Complementary) لتسلسل الجدلة على طرفي المنطقة المراد تضخيمها. لا بد من تصميم تسلسل

البادئات لتلتحم (Anneal) كل واحدة بشكل دقيق مع إحدى الجدلتين المتقابلتين (Opposite strands) اللتين تقومان بدور قالب (Template). كما يجب لكل بادئ أن يلتحم مع الجدلة القالب على طرفها ´3، بحيث يكون طرف ´3 للبادئ موجهاً نحو المنطقة المراد تضخيمها. ومما لا شك فيه أن خصوصية عمل بادئي التفاعل والتحامهما الصحيح (كل مع قالبه) هو الضمانة لتضخيم المنطقة المرغوبة في تفاعل الـــPCR. من أهم مميزات تفاعل الـــPCR هو أن عملية التضخيم تتم بالكامل في أنبوب مخبري واحد يحوي على الأنزيم والـــDNA القالب المراد تضخيمة، وزوج من بادئات التفاعل والمواد الأولية. وكل دورة تضخيم (Amplification cycle) تشمل على الالتحام (Annealing)، ثم التصنيع أو الإطالة بالبلمرة (Extension) ثم المسخ (Denaturation) أو انفصال (Dissociation) الجدلتين، وذلك على درجات حرارة مختلفة (الشكل 8.4). بما أن خطوة انفصال الجدلتين تتم بدرجة حرارة عالية (حوالى 95ºC) وتتكرر في 35 دورة في تفاعل PCR واحد، لذلك كان من الضروري استعمال أنزيم بلمرة DNA ثابت ومقاوم للحرارة.

لقد تم استخلاص أنزيم البلمرة "تاك" (Taq polymerase) من أركيا بكتيريا تُدعى ثيرموس أكواتيكس (*Thermus aquaticus*) التي تنمو في أحد الينابيع الحارة في إيسلاندا. إن هذا الأنزيم هو أول أنزيم تم عزله لهذا الغرض واستعماله في الـــPCR. ولكن "تاك" يفتقد وظيفة القراءة التصحيحية (Proofreading) نظراً إلى عدم قدرته على تحليل الحمض النووي من الطرف ´3 باتجاه ´5، أي لافتقاره لنشاط إكزونيوكلييز على طرف ’3 (’3 Exonuclease). نتيجة هذا النقص في هذا الأنزيم، فإن نسبة الخطأ خلال بلمرة النيوكليوتيد تكون عالية. ولكن هناك أنزيماً آخر (Pfu) ثابتٌ حرارياً، ويقدّر أن يقوم بالقراءة التصحيحية (Proofreading) تم عزله واستخلاصه من أركيا بكتيريا (Pyrococcus furiosus). هذا الأنزيم أكثر دقه في البلمرة حيث إن نسبة الخطأ (Misincorporation) فيه تكون أقل ما يمكن.



الشكل 8.4: تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. يبين هذا المخطط الطبيعية الدورية للتفاعل التي تشمل الالتحام (annealing)، والتصنيع (synthesis) والمسخ (denaturation) أي فصل الجدلتين، التي تتكرر أوتوماتيكياً في آلة الـPCR المبرمجة (Thermocycler).

إن الخطوة الأولى في تفاعل الــPCR (الشكل 8.4) تتم على حوالى درجة 95ºC وهي خطوة المسخ (Denatuartion) أو انفصال (Dissociation) الجدلتين في الــDNA القالب (Template) عن بعضهما البعض. بعد ذلك يتم تبريد أنبوب التفاعل كي يتسنى لبادئي التفاعل (Primers) الالتحام (Anneal) مع أطراف الــDNA أحادي الجدلة المتممة (Complementary). تعتمد درجة الحرارة خلال عملية الالتحام على طول سلسلتي البادئين ومحتواهما من القواعد G وC. ولكن بشكل عام تتراوح حرارة الالتحام بين 50ºC و 65ºC. بعد خطوة الالتحام تُرفع درجة الحرارة إلى 70ºC (وهي الدرجة المثالية للبلمرة بواسطة أنزيمات الــDNA بوليماريز الثابتة حرارياً) لتصنيع الجدلة المكملة (Complementary). تشكل الخطوات الثلاث، الانفصال والالتحام والإطالة (Denaturation وannealing و extension) دورة واحدة من دورات تفاعل الـــ PCR، وتتكرر هذه الدورة بشكل عام بين 20 إلى 35 مرة. إن أكبر قطعة DNA يمكن تضخيمها بالــPCR باستعمال أنزيم البلمرة "تاك" تبلغ حوالى 4kbp، ولكن من خلال تعديلات وتحسينات في ظروف التفاعل وباستعمال مزيج من أنزيمات البلمرة الثابتة حرارياً يمكن تضخيم القطعة حتى تصل 40 kbp.

تم تطوير الــPCR ضمن تطبيقات عديدة منها دراسة تسلسل الــDNA (Sequencing)، وإدخال طفرة محددة بتغيير نيوكليوتايد واحد بموقع معين (Site-directed mutagenesis)، وفي عمليات وسم الــDNA (Labelling)، وفي دمج قطع DNA من مورثات مختلفة لإنتاج جينات كيمرة (Chimeric). إضافة إلى ما تقدم، يمكن تصميم بادئي التفاعل بحيث يحتوي كل منهما على طرفه موقعاً حصرياً (Restriction site) لأنزيم حصري (Restriction enzyme) محدد، بحيث يصبح الجزيء الناتج من الــPCR قابلاً لقطع بذلك الأنزيم وقابلاً للصق والدمج مع ناقل (Vector) تم قطعه أيضاً بنفس الأنزيم. (الشكل 5.4). هناك أيضاً تطبيقات أخرى مثل الــPCR بالوقت الحقيقي (أو Real time (RT) PCR) التي تُستخدم لتحديد كمية أو مستوى التعبير الجيني لكل مورث بذاته. في

هذه التقانة يتم نسخ معكوس للـــRNA الرسول إلى الـــDNA المتمم (Complementary) وذلك بمساعدة أنزيم بلمرة DNA المُعتمِد على قالب من الـــRNA (RNA-dependent DNA Polymerase). ثم يستعمل ذلك الـــDNA كقالب في عملية تفاعل PCR بالوقت الحقيقي (RT-PCR) الذي يقتضي استعمال بادئي تفاعل موسومَين بمادة مضيئة فلوريسية (Fluorescent). تكون المادة المضيئة خاملة قبل بدء التفاعل (ومتصلة ببادئ التفاعل)، ثم يتم إطلاق الضوء منها خلال عملية البلمرة بالتناسب مع كمية الـــdsDNA الناتج من تفاعل التضخيم، فمن خلال القياس المتواصل للضوء الناتج من تراكم المادة المضيئة يمكن حساب كمية الـــDNA الناتج في التفاعل بالوقت الحقيقي (أي بالتزامن مع سير التفاعل)، إذ إن آلة الـــPCR (Thermocycler) هي في نفس الوقت جهاز قياس للضوء (Fluorimeter). ففي كل دورة PCR تتراكم المادة المضيئة ويتم قياسها بواسطة جهاز الـــPCR. وتُعتبر هذه التقانة عالية الحساسية والدقة والتكرار (Reproducible)، أي إنها ذات نتائج ثابتة عند تكرار التجربة.

5.4.4 التحويل بإدخال DNA وطرق أخرى لنقل الجين

Transformation and other gene transfer methods

إن القدرة على إدخال DNA غريب إلى وسط البكتيريا المضيفة يُعدُّ مركزياً في تقانة الـــDNA المأشوب (Recombinant DNA technology). فعملية التحويل (Transformation) من خلال إدخال قطعة DNA خارجية المنشأ (Exogenous) إلى داخل خلية المضيف، تعتبر الطريقة الأكثر استعمالاً وشيوعاً في عمليات الانتساخ (cloning). بعض أنواع البكتيريا تمتلك بطبيعتها منظومة التحويل (بروتينات مسؤولة عن نقل الـــDNA) بينما تحتاج أنواع بكتيريا أخرى مثل الـــE. coli إلى معالجة كيميائية لجعلها قابلة ومؤهلة (Competent) لاستقبال الـــDNA الغريب.

بالرغم من كون تقانة التحويل هذه ذات كفاءة جيدة بالنسبة إلى معظم أهداف الانتساخ، إلا أن بعض الحالات كتحضير المكتبات الجينية (Genomic libraries)

لا تكتفي بذلك المستوى من الفعالية. يمكن تقديم الدعم في هذه الحالة عن طريق رزم (Packing) الــDNA المأشوب المراد دراسته في جسيمات فيروسية (Viral particles) في الأنبوب (In vitro) (انظر الفقرة 2.5.4). وحديثاً تبين بأن تعريض البكتيريا لصعقات كهربائية (Pulse تستغرق بضع أجزاء من ألف من الثانية أي) وذات توتر (فولتية) عالٍ يصل إلى 2500 فولت. تسمى هذه الطريقة "الثقب الكهربائي" (Electroporation) وتُجرى على البكتيريا المضيفة ممزوجة مع الــDNA، ويتسبب الحقل الكهربي بإحداث ثقوب في الغلاف الخلوي مما يسمح للــDNA المشحون سلباً بالدخول، إذ إنه هو أيضاً يتحرك نتيجة الحقل الكهربي. وتعتبر هذه الطريقة أكثر فعالية من التحويل (Transformation) الطبيعي فإن بعض أنواع البكتيريا لا يمكن إدخال الــDNA إليها من دون استخدام هذه الطريقة.

6.4.4 انتقاء وعزل الخلايا المحورة المؤشبة

Selection and screening of recombinants

بعد كل عملية كلونة (Cloning) لا بد من إجراء عملية انتقاء للنسيلة (Clone) ولكي يتم فصل وعزل الخلية التي تحمل الجين أو قطعة الجين المقصودة، يجب عزلها وفصلها عن باقي الخلايا. أبسط مستوى لإتمام ذلك يكون عن طريق انتقاء الخلايا المضيفة التي دخل الناقل إليها. لهذا الهدف يتم استعمال ناقل يحمل مورثاً مسؤولاً عن مقاومة المضاد الحيوي، وإذا ما أضيف المضاد الحيوي المناسب للوسط الغذائي حيث تنمو الخلايا المضيفة، فإن الخلايا التي تستطيع النمو هي فقط تلك التي دخل الناقل إليها واستقر. إضافة إلى ذلك، تم تطوير أنظمة أكثر ذكاء وفعالية تسمح بتمييز الخلايا المضيفة التي تحتوي على ناقل لم يُلصق فيه DNA غريب من تلك التي تحتوي على ناقل لُصق فيه DNA غريب. تعتمد الطريقة على تمزيق المورث (Gene disruption)، ما يؤدي إلى اختفاء صفة معينة لهذه البكتيريا نتيجة لصق الــDNA الغريب في داخل مورث تلك الصفة (المورث على الناقل بالطبع) ما يتسبب بمنع الترجمة (انظر الفقرة 4.5.4).

يمكن التعرف مباشرة على هوية النسيلة (Clone) التي تحتوي على جين محدد أو قطعة منه بطريقة الانتقاء (Selection) أو بطريقة غير مباشرة من

خلال رسم خريطة قَطْع الأنزيمات الحصرية (Endonuclease Mapping)، أو بواسطة الـــPCR، أو بواسطة تقانات التهجين (Hybridization). كما يمكن انتقاء النسيلة من خلال استخدامها لتكملة نقص في خلايا المضيف (Complementation of defect in the cloning host). كمثال على تكميل النقص نذكر استعادة البكتيريا (بفضل الـــDNA الغريب) لقدرتها على استعمال مادة أولية معينة للنمو، أو استعادة القدرة النمو في غياب مادة أولية أساسية.

خلال عملية الانتقاء بتقانة رسم خريطة قَطْع الأنزيمات الحصرية (Endonuclease mapping)، حيث يتم فيها استخلاص البلازميد (الناقل) من نسائل عدة ويُقطع بأنزيمات حصرية معينة، ثم يتم فصل القطع الناتجة بالرحلان الكهربائي (Electrophoresis) في هلام من "الأغاروز" (Agarose) لكشف عددها وطول كل منها. بناء على عدد القطع الناتجة (التي تبدو كأشرطة "Bands" في الهلام) وطول كل منها، يتم التعرف على النسيلة الحاملة للـــDNA المستهدف. تُستعمل هذه الطريقة عندما تكون احتمالية وجود القطعة المطلوبة من الـــDNA المستنسخ، عالية جداً بين الخلايا المراد مسحها والانتقاء منها. أما في طريقة الانتقاء بواسطة الـــPCR، فيتم استعمال بادئي تفاعل (Primers) مطابقين لأطراف قطعة DNA المطلوبة لفحص الـــDNA من نسائل عديدة، فإذا حصلنا على تضخيم ناتج في التفاعل فهذا دليل على أن العينة تحتوي الـــDNA المُستهدف. وبما أنه يمكن استعمال هذه الطريقة مباشرة على عينات من البكتيريا (بدون معالجة خاصة أو استخلاص للحمض النووي) فإنه بالإمكان فحص عدد أكبر من النسائل مقارنة بالطريقة السابقة.

إذا كان احتمال وجود الـــDNA المطلوب قليلاً جداً كما في حالة المكتبات الجينية (انظر الفقرة 5.5.4)، فإنه يتعين فحص عدد أكبر من النسائل. هنا تُعتمد طريقة التهجين (Hybridization) على مستعمرات (Colonies) البكتيريا التي تنحدر كل منها من خلية أم واحدة، وفي حالة استعمال ملتهم ناقل (Phage vector)

يكون التهجين على الصفيحة الفيروسية (Viral plaque)[*]. ويتم التهجين، سواء كان على مستعمرات (Colonies) البكتيريا أو على الصفائح الفيروسية، باستخدام مسبار (Probes) مكوَّن إما من DNA أو من RNA ذي تسلسل محدد، ويقدر على تمييز الـــDNA المطلوب والالتحام (Anneal) معه في مستعمرة أو صفيحة فيروسية محددة. يتم التهجين بعد نقل كتلة المستعمرة البكتيرية او الصفيحة الفيروسية على غشاء خاص (Membrane) وتثبيته عليها، حيث يتم المسخ (Denaturation) لجزيئات الـــDNA (أي فصل الجدلات عن بعضها البعض)، وذلك بعد تدمير غلاف الخلايا وتحريرها. يوضع المسبار الموسوم (Labelled probe) بعدئذٍ (انظر الفقرة 7.4.4) مع الغشاء ويلتحم مع الـــDNA المطلوب والمثبت على الغشاء في موضع محدد يُكشف عنه من خلال المسبار.

7.4.4 مسبارات الأحماض النووية والتهجين
Nucleic acid probes and hybridization

تُستعمل مسبارات الأحماض النووية للكشف عن وجود الـــDNA المستهدف. عادة يكون المسبار ذائباً ويلتحم أو يُهجِّن (Hybridize) الـــDNA المستهدف والمثبت (Immobilized) على مسند صلب (Solid support) مثل النايلون أو السلكون أو النايتروسللوز. ينعكس هذا الوضع في حالة "مصفوفة الـــDNA" (DNA array) (انظر الفقرة 8.4.4). لقد تم استعمال التهجين (Hybridization) في تطبيقات عديدة للتقانة الحيوية، منها الكشف عن الـــDNA المكلون (كما سبق في الفقرة 6.4.4)، وكذلك منها تحليل التنظيم الجيني (Genetic organisation) وتشخيص الأمراض الوراثية. بالرغم من تطبيق التهجين في أطر متنوعة فإن أسس ومبادئ هذه التقانة هي ذاتها مهما كانت التطبيقات. يقوم مبدأ التهجين على قدرة مسبار الحمض النووي أحادي الجدلة (DNA كان أو RNA) على الالتحام مع الجدلة المكملة (Complemetary) على الحمض النووي المستهدف (DNA كان أو RNA) فقط، وذلك رغم وجوده

---

[*] الصفيحة أو plaque هي منطقة شفافة على سطح الوسط الزرعي الملقح بالملتهمة الفيروسية، وتمثل هذه المنطقة حيزاً تدميرياً لأثر الملتهمة في الوسط الزرعي البكتيري.

(الحمض النووي المستهدف) بين مزيج من جزيئات الحمض النووي غير المكملة التي لا يلتحم معها المسبار.

سميت التقانة الأساسية استناداً إلى مكتشفها "Ed Southern" بـــ Southern blotting أو "وصمة ساوثرن" التي تتضمن قطع الـــDNA بأنزيمات حصرية لإنتاج قِطع متفاوتة الطول يتم فصلها عن بعضها البعض بواسطة الرحلان الكهربائي في الهلام، ثم تُنقل (Transfer) وتُوصم (Blotting) وتُثبت على غشاء من النيتروسيلليلوز. يُضاف مسبار الحمض النووي إلى الغشاء في محلول مائي، وذلك في الظروف المُثلى لتفاعل التهجين كي يتم التحام المسبار مع الـــDNA المستهدف والمثبت على الغشاء. يتم الكشف عن موضع التحام مسبار الحمض النووي على الغشاء من خلال وسمة معينة تنتج لطخات واضحة. بعد تطبيق هذه التقانة للكشف عن وجود الـــRNA المطلوب أصبحت الطريقة تسمى "وصمة نورثرن" أو Northern blotting (انظر الفقرة 1.7.4).

يجب أن تكون جزيئات الحمض النووي المسبار المستعمل في تقانة التهجين ذات جدله واحدة سواء كان المسبار DNA أو RNA. وفي حال كان المسبار ثنائي الجدلة فلا بد من عملية مسخ (Denaturation) لفصل الجدلتين قبل بدء تفاعل التهجين. وبما أن الحمض النووي المسبار يهدف إلى كشف حمض نووي ذي تسلسل معين، فلا بد للمسبار من أن يكون كشفه سهلاً. عادة يتم وسم المسبار بذرة مشعة مثل الفوسفور 32 (^{32}P) والكبريت 35 (^{35}S) بحيث تُصبح عملية كشف موضع المسبار على الغشاء (بالتالي الحمض النووي المستهدف) غاية في السهولة، ويتم ذلك بواسطة التصوير الشعاعي الذاتي (Autoradiography)، أي بعرض الغشاء على فلم حساس للأشعة السينية، ينطبع بالإشعاعات الناتجة من المسبار.

نتيجة القلق بشأن التلوث في العقود الأخيرة، تم تطوير طرق جديدية لوسم المسبار تتجنب استعمال الذرات المشعة. لقد تم تصنيع أشباه (Analogue) للنيوكليوتايد متصلة بمركب بايوتين (Biotin) أو ديكوكسيجنين (Digoxygenin) يتم دمجها (Incorporated) بدلاً من الأصل ضمن سلسلة نيوكليوتيدات المسبار من

خلال تفاعل البلمرة. ثم يُستخدم جزيء آخر يتآلف ويرتبط (Ligand) مع شبيه النيوكليتيد (مثلاً ستربتافيدين في حالة البايوتين) الذي دُمِج في المسبار، على أن يكون ذلك الجزيء قد رُبط مسبقاً مع أنزيم تحليل بيروكسيد أو بيروكسديز (Peroxidases) أو أنزيم قلوي لتحليل الفوسفات أو أكلتاين فوسفاتيز (Alkaline Phosphatase). والهدف من الارتباط مع الأنزيم هو الكشف عن موقع المسبار بعد التهجين. مثلاً يقوم الأنزيم بقطع مادة أولية (Substrate) غير ملوَّنة بذاتها ولكنها تتحول إلى مادة ملونة (Chromogenic)، يتم قطعها إلى مُنتَج مرئي ملوَّن. يمكن للمادة الأولية التي يقطعها الأنزيم أن تقوم بتفاعل كيميائي ضوئي (Chemiluminescent)، في هذه الحالة يتم الكشف عن المسبار باستخدام أفلام حساسة كما في طريقة التصوير الشعاعي الذاتي (Autoradiography) عندما يكون المسبار موسوماً بعنصر مُشع.

تكون الأفضلية للمسبار المُكوَّن من RNA عندما يكون الحمض النووي المُستهدف هو جزيء RNA، أي في تقانة "وصمة نورثرن" أو Northern Blotting، ويُصنع هكذا مسبار في الزجاج (*in vitro*) بواسطة أنزيم بلمرة الـــRNA من "ملتهم" (Phage RNA Polymerase). يجب في هذه الحالة استعمال ناقل يحتوي على محرك من الملتهم (Phage promoter) ودمج الـــDNA المستهدف (أو قطعة منه) مباشرة خلف المحرك المذكور. بعد استخراج وعزل البلازميد في أنبوب، يضاف أنزيم بلمرة الـــRNA من "ملتهم" مع المواد الأولية اللازمة، ويبدأ تصنيع جدلة الـــRNA المكمِّلة للحمض النووي المستهدف. يتم دمج الجزيء الواسم للمسبار (مشعاً كان أم مشابهاً للنيوكليوتيد) خلال عملية البلمرة، تماماً مثل عملية وسم المسبار المصنوع من DNA.

8.4.4 تقانة مصفوفة الـــDNA — DNA array technology

إن توفُّر التسلسل الجينومي الكامل للعديد من الأحياء الجرثومية والتطور في تقانة التصنيع المجهري الدقيق (Microfabrication) قد أدى إلى تطوير تقانة ذات قدرة عالية تمكننا من فحص مستوى التعبير الجيني لكل مورثات الخلية البكتيرية في وقت واحد ومن خلال تجربة مخبرية واحدة. لقد شكلت تقانة مصفوفة الـــDNA

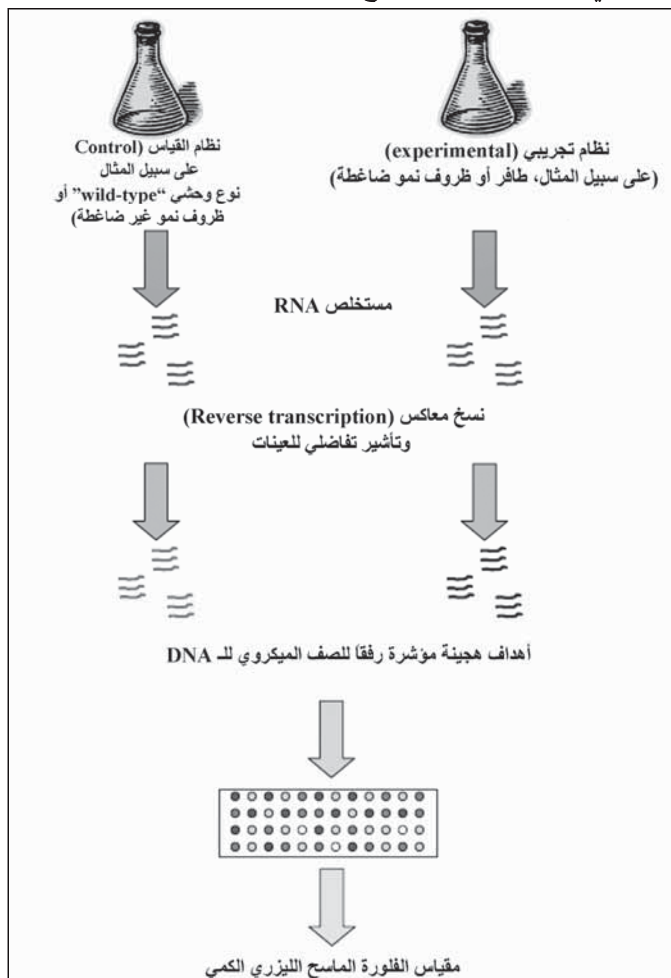
(DNA array) ثورة حقيقة في مجال التعبير الجيني ورؤيته الإجمالية (انظر الشكل 9.4). يساعد التصنيع المجهري الدقيق (Microfabrication) بإلصاق مسبارات بكثافة عالية لجينات محددة، على سطح زجاجي أو سليكوني يشكل المصفوفة (Array) أو الرقاقة (Chip). وهناك نوعان من المسبارات يمكن استعمالها في هذه التقانة، إما أن تكون منتج PCR يحتوي على الجين كاملاً أو على بعض أجزائه مثل "إطار القراءة المفتوح" (ORFmer)، وإما أن تكون سلاسل قصيرة من نيوكليوتيد (أوليغونيوكليوتيد Oligonucleotide) يتراوح طولها بين 20 و70 وحدة. وفي معظم الأحيان تُصنَّع جُزيئات المسبار أولاً، ثم بعد ذلك يتم لطخها على المصفوفة باستعمال طابعة آلية (Robotic printer). وفي طريقة أحدث، تُستعمل تفاعلات بالرسم الضوئي (Photolithography) لتصنيع أوليغونيوكليوتيد المسبار في الموقع (in situ) الذي يُلصق به. تكون كثافة المسبار بين 10000 إلى 500000 لطخة في المصفوفة الواحدة حسب ميكانيكية الطبع المستخدمة.

في هذه التقانة يتم وسم الحمض النووي المستهدف (Target nucleic acid) (في حين أن المسبار على المصفوفة غير موسوم). غالباً ما يكون الوسم بصبغة مضيئة فلورسينية (Fluorescent dye) خلال عملية النسخ العكسي (Reverse transcription) للــRNA الرسول، يُنتِج ذلك DNA مُكمِّلاً موسوماً مقابلاً كل RNA رسول. إن استخدام صبغتين مكملتين لبعضهما البعض Cy3 (ذات لون أخضر) وCy5 (ذات لون أحمر) يُسهِّل عملية المقارنة المباشرة بين ومضات اللون الناتجة من مصدرين مختلفين من المسبار في مصفوفة واحدة. ويتم قياس كمية الضوء باستعمال جهاز (Laser-Scanning Fluorimeter) لقياس ومسح اللون الضوئي باستعمال أشعة الليزر. تُحفَّز الصبغة Cy3 بتعريضها لموجة ضوئية بطول 532 نانومتراً وتشع الضوء على موجة بين 557 و592 نانومتراً. بينما يُحفَّز الــCy5 بموجة 635 نانومتراً وتشع على موجة بطول 650 إلى 690 نانومتراً.

9.4.4 سَلسَلَة الــDNA — DNA Sequencing

تسمح تقانة سَلسَلة الــDNA بالكشف عن ترتيب القواعد في الجدلة. إنها أكثر التقانات مقدرة على تحليل الــDNA والتلاعب فيه بشكل مُحكَم. إن معرفة

تسلسل القواعد في الــDNA المستهدف وفي DNA الناقل تُشكِّل ضرورة للتمكن من تصميم أنظمة بكتيرية متطورة لإنتاج بروتين محدد. وهي ضرورية أيضاً لتصميم مسبارات مختلفة وبادئات تفاعل مختلفة، وهي مهمة أيضاً لرسم خرائط حصرية (Restriction maps) وخرائط نسخية (Transcriptional maps) بمساعدة برامج الحاسوب التي تُحلل التسلسل الناتج.



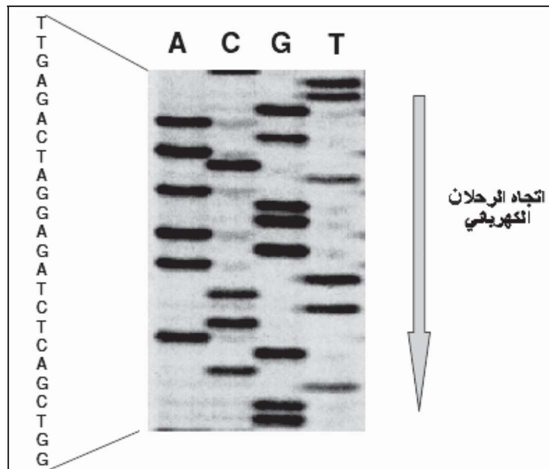
الشكل 9.4: مبدأ تجربة مصفوفة الــDNA لمقارنة النمط التعبير الجيني في نظام اختباري مقارنة بنظام شاهد أو ضابط (control).

تعتمد طريقة "ماكسام" و"جلبرت" (Maxam وGilbert) في تحديد تسلسل القواعد في جزيء DNA ما على استعمال مواد كيميائية تتفاعل مع قواعد الــDNA بخصوصية تُؤدي إلى قَطع الجدلة بناء على طبيعة القاعدة النيوكليوتيدية (Base-Specific Cleavage) أي أنه ليس قطعاً عشوائياً. وبالرغم من أن هذه التقانة

لازالت تُستَعمل في بعض التطبيقات، فقد أخذت مكانها تقانة حاذقة طُوِّرت من قبل "سانغر" Sanger و زملائه، وتعتمد على إيقاف عملية البلمرة. في هذه التقانة يُعتَمد على قدرة أنزيم بلمرة الـــDNA المستخلص من بكتيريا E. coli والمعروفة باسم شظية كلينوف Klenow Fragment من تصنيع جدلة مكملة لـــDNA قالب (Template) مكوَّن من جدلة واحدة. كما يقدر هذا الأنزيم على استعمال قواعد نيوكليوتيدية اعتيادية (نيكليوتايد منقوصة الأوكسيجين على الكربون الثاني -2 Deoxynucleotides) إضافة إلى شبيهاتها مثل نيوكليوتايد منقوص ذرتين أوكسيجين من الكربون الثاني والثالث (داي ديوكسي نيوكليوتايد -2,3 dideoxynucleotide) . بما أن هذا الأخير يفتقد مجموعة هايدروكسيل في الموقع ´3 فإن اندماجه في السلسلة (قيد التصنيع) يؤدي إلى توقف عملية البلمرة واستحالة إضافة نيوكليوتيد آخر فتتوقف عملية تطويل السلسلة (Chain elongation). خلال تفاعل السَلسلَة نحتاج إلى بادئ تفاعل محدد يمثل نقطة بداية التفاعل في كل الجزيئات التي تُبلمر. يتم تطويل بادئ التفاعل من خلال البلمرة، بالتالي يكون بادئ التفاعل هو نفسه في كل الجزيئات المصنَّعة في التفاعل. يحتاج التفاعل بالطبع إلى الـــDNA المراد اكتشاف سلسلته، ولا بد أن يكون ذا جدلة واحدة كي يتسنى استعماله كقالب في وجود أربعة انواع من جزيئات النيوكليوتيد ثلاثية الفوسفات (وهي dATP، dCTP، dGTP، dTTP) وهي المواد الأولية للبلمرة. تكون إحدى تلك الجزيئات الأربعة موسومة بعنصر مشع مثل α-^{35}S -dATP). يتم إجراء نفس التفاعل في أربعة أنابيب تحتوي على نفس المواد والأنزيم، إلا أن كل أنبوب يُضاف عليه نوع من الأنواع الأربعة من داي ديوكسي نيوكليوتايد 2,3-dideoxynucleotide (وهي ddATP، ddCTP، ddGTP، ddTTP) أو ddNTP، وذلك بتركيز قليل مقارنة بنيوكليوتيد العادي. عندما تكون نسبة تركيز dNTP و ddNTP صحيحة فإن تفاعل البلمرة يتوقف على كل مواضع السلسلة (نتيجة اندماج ddNTP) مُنتِجاً جدلات لها نفس الطرف ’5 (بادئ التفاعل) بينما تختلف في الطرف ´3 حيث توقفت البلمرة بموقع عشوائي تحل فيه القاعدة من نوع الداي ديوكسي. يتم بعد ذلك فصل الجدلات ذات الأطوال المختلفة (في كل واحد من الأنابيب الأربعة) بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام ماسخ (Denaturing polyacrylamide gel) من أكرليميد متعدد. لإظهار

النتيجة لعملية السَلسَلة يتم التصوير الشعاعي الذاتي للهلام (Autoradiography) بعرضه على فلم أشعة فنحصل على شرائط (Band) تُمثِّل كل واحدة منها قطعة DNA مختلفة بطولها عن الأخرى (الشكل 10.4).

إن الحاجة الماسة لمشاريع سَلسَلة الـــDNA على نطاق واسع دفعت العلماء إلى تطوير تقانة آلية (أتمتة) سريعة للسَلسَلة (Automation of DNA Sequencing). تم التوصل إلى ذلك من خلال تغيير الشكل أو الوسيلة التي يتم فيها إيقاف البلمرة بحيث يمكننا الكشف عن القطع الناتجة من تفاعل السَلسَلة في الوقت الحقيقي (Real time) حيث أصبح من الممكن قراءة النتائج مباشرة في جهاز شعري (Capillary) للرحلان الكهربائي، بدلاً من استعمال الهلام والتصوير الشعاعي الذاتي. تتم القراءة المباشرة بفضل وسم قِطع الـــDNA بألوان فلورسية (Fluorescent dye). بهذه الطريقة أصبح بالإمكان تحديد تتابع القواعد في سلسلة لا يقل طولها عن ألف قاعدة في تفاعل واحد، وتظهر النتائج على الحاسوب مباشرة في صيغتها الإلكترونية.

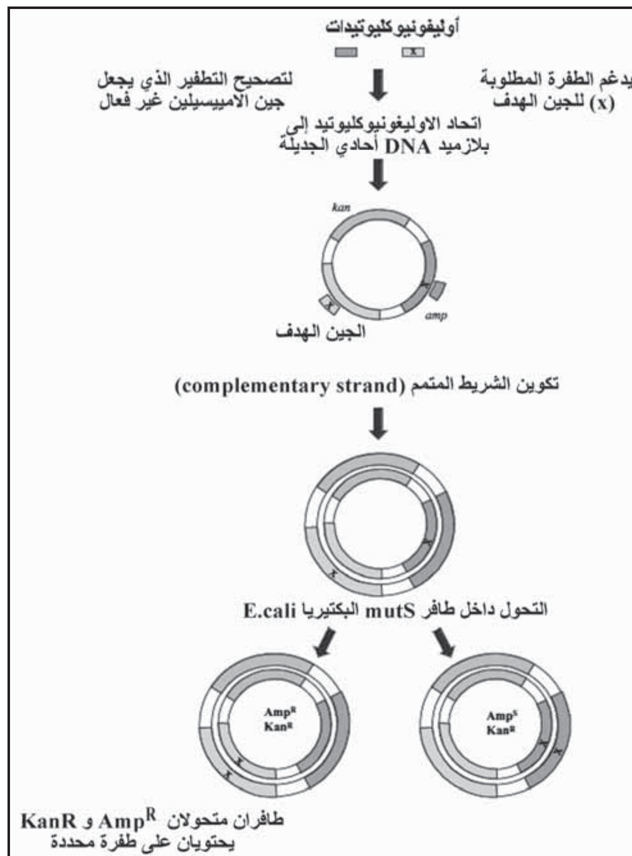


الشكل 10.4: صورة شعاعية ذاتية (autoradiograph) لجزء من هلام لتفاعل سَلسَلة القواعد النيوكليوتيديه للـــDNA باستعمال طريقة "سنغر" Sanger المعتمدة على توقف البلمرة (Sanger chain termination method). سُمِّيَت الممرات الأربع A و C و T و G بناء على النيوكليوتيد التي توقفت البلمرة عليه (A= أدنين، C= ساتيوسين، G= غوانين، T= ثايمين). يظهر إلى اليسار التسلسل المنكشف على صورة الهلام كنتيجة للتفاعل.

10.4.4 الطفرة الموجهة لموقع Site-directed mutagenesis

"الطفرة الموجهة لموقع" هي عبارة عن تغيير خاص في تسلسل النيوكليوتيد في موقع محدد من الـــDNA، يكون القصد من الطفرة تحليل وتحديد فعالية جين معين أو ناتجه. على سبيل المثال يتم استعمال الطفرة الموجهة لموقع، لاستبدال بعض من الأحماض الأمينية في أنزيمات صناعية بهدف تحسين مميزاتها وخصائصها. يتم إجراء الطفرات على الـــDNA بتقانات في الزجاج (*In vitro*)، ثم بعد ذلك يعاد الـــDNA حامل الطفرة إلى داخل البكتيريا لمعرفة التغيرات الناتجة في الصفات الشكلية (Phenotypes). تُعتبر تقانة "الطفرة الموجهة لموقع" باستعمال أوليغونيوكليوتايد الأكثر أهمية للوصول إلى ذلك الهدف، وذلك لأنها تؤدي إلى تغيير محدد ودقيق على سلسلة الـــDNA المستهدفة. وبالرغم من تطوير عدة طرق لتنفيذ "الطفرة الموجهة لموقع" إلا أن المبدأ يتشابه كثيراً كما يبين الشكل 11.4). يتم أولاً انتساخ (Cloning) الـــDNA المستهدف في بلازميد ذي قدرة على البقاء بشكل أحادي الجدلة خلال عملية المضاعفة (الفقرة 4.5.4). إضافة إلى الـــDNA المستهدف، يحتوي الناقل على مورثين واسمين (Markers) مسؤولين عن مقاومة المضادات الحيوية. أحد هذين المورثين تم تعطيلة باستبدال قاعدة نيوكليتيدية واحدة. يتم التحام (Annealing) البلازميد أحادي الجدلة مع اثنين من أوليغونيوكليوتيد بادئ التفاعل، الأول يلتحم مع الجين المستهدف في الموقع المُراد (إلا في موقع القاعدة قيد التحويل أو الاستبدال)، بينما يلتحم الثاني مع الموقع المكمّل المعطل (موقع الطفرة) في مورث مقاومة الأمبيسيلين بحيث يتم استبدال القاعدة غير الصحيحة بأخرى صحيحة تؤدي إلى استعادة وظيفة مقاومة الأمبيسيلين للمورث الطبيعي. إن إضافة أنزيم بلمرة الـــDNA (DNA Polymerase) وأنزيم لصق الـــDNA (DNA ligase) يؤدي إلى تصنيع الجدلة المكمِّلة. ويحتوي البلازميد الناتج قصداً على نقطتين من عدم التكامل (Mismatch)، الأولى في مورث مقاومة الأمبيسيلين (وستقوم بإصلاح طفرته الموجودة سابقاً) والثانية في الجين المستهدف (وستؤدي إلى إدخال الطفرة المطلوبة في الموقع المحدد). ثم يُنقل البلازميد (حامل نقطتين من عدم التكامل) إلى بكتيريا مضيفة E. coli ذات مورث mutS غير فعال، بسبب طفرة، وهذا المورث يدخل في نظام إصلاح الجدلات غير المتكاملة في الـــDNA (Mismatch repair

system). بالتالي تتم مضاعفة البلازميد الحامل لنقطتي عدم التكامل، وينتج من ذلك جزيئين من البلازميد بدون أي نقص في التكامل، أحد هذين الجزيئين يحمل الطفرات المطلوبة (التي تم إدخالها بواسطة بادئي التفاعل، أي الأوليغونيوكليوتيد) والآخر مطابق للبلازميد الأساسي. عند انقسام الخلية تحصل الخلية البنت على أحد هذين الجزيئين من البلازميد، ثم يتم انتقاء الخلايا التي تحتوي على الطفرة المنشودة من خلال إضافة الأمبيسيلين إلى الوسط الغذائي، إذ إن حدوث الطفرة يؤدي إلى استعادة نشاط مورث مقاومة الأمبيسيلين.



الشكل 11.4: الطفرات الموجهة لموقع (site–directed mutation). يتم إدخال الطفرات المحددة في أوليغونيوكليوتيد، ثم يلتحم (anneal) مع بلازميد أحادي الجدلة يحمل المورث المستهدف. ثم يتم تصنيع الجدلة الثانية. بعد تحويل E. coli بهذا البلازميد يتم انفصال البلازميد حامل الطفرة عن البلازميد الأصلي في الذرية الناتجة من الانقسام. ثم يتم انتقاء البلازميد حامل الطفرة بناء على استعادته لنشاط مورث مقاومة الأمبيسيلين.

5.4 ناقلات الكلونة ومكتبات الكلونة

Cloning Vectors and Libraries

ناقل الانتساخ أو الكلونة (Cloning vector) هو عبارة عن جزيء DNA يحمل الــDNA المنقول بحيث يُمَكِّنُه من التضاعف داخل البكتيريا المضيفة. إن الــDNA الناقل والــDNA المنقول مرتبطان مع بعضهما البعض برابط تساهمي (Covalent) بمساعدة أنزيم لصق (Ligase) الــDNA المذكور سابقاً (انظر الفقرة 3.4.4). هناك أربع ميزات أساسية للناقل وهي: أولاً: لا بد من أن يكون إدخال الناقل إلى البكتيريا المضيفة سهلاً من خلال عملية تحويل (Transformation) أو من خلال تغليف الناقل بغلاف فيروسي، في الزجاج (*In vitro* packaging) و إجراء عدوى (Infection)؛ ثانياً: لا بد للناقل من القدرة على المضاعفة داخل البكتيريا المضيفة بشكل غير مرتبط بمضاعفة كروموسوم البكتيريا، بحيث تُنتِج المضاعفة عدد نسخ يتراوح بين 50 إلى 200 نسخة. ثالثاً، لا بد من وجود مواقع وحيدة للقطع بأنزيمات حصرية متعددة (التي تقطع الــDNA داخليا). رابعاً: لا بد أن يحتوي على صفة معينة يمكن بواسطتها تمييز واختيار الخلية المضيفة التي تحتوي على نسخة من الناقل. ينحدر الملتهم الانتساخ من جزيئات DNA موجودة في الطبيعة مثل البلازميد والملتهم الذي يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف كروموسوم الخلية المضيفة. ولقد تم تطوير أنواع كثيرة من الملتهمات لتطبيقات خاصة، كما سيرد بعد قليل.

1.5.4 النواقل البلازميدية للاستعمال العام

General purpose plasmid vectors

صُممت النواقل البلازميدية للاستعمال العام لانتساخ قطع صغيرة من الــDNA لا تتجاوز l0 kbp وذلك باستعمال E.coli كخلية مضيفة. تُدخل هذه النواقل إلى الخلية المضيفة بعملية تحويل، ثم يتم انتقاء الخلايا التي دخل إليها الناقل على أساس مورث مقاومة المضادات الحيوية الموجود في الناقل (Vector-based antibiotic resitance gene). في البلازميد الحديث المصمم للاستعمال العام هناك

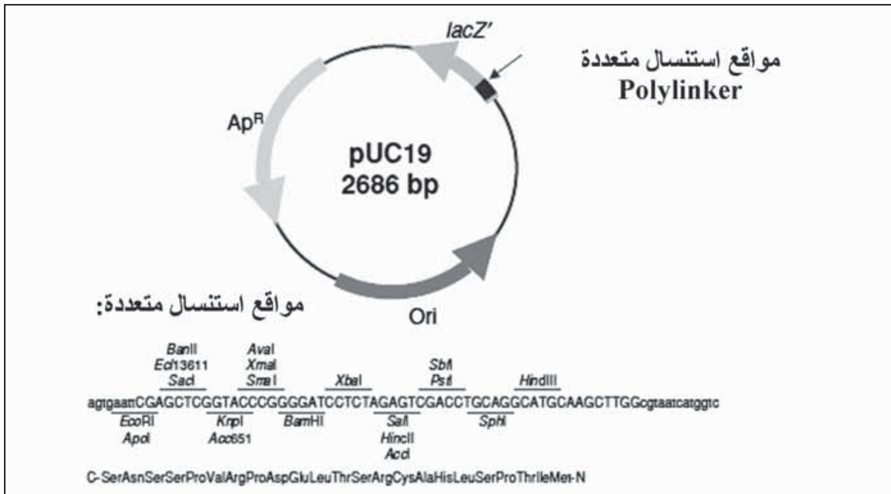
قطع مصممة حسـب الهدف (مواقع الكلونـة المتـعددة أو MCS أو Multiple clonning site، وهي عبارة عن مجموعة متقاربة من المواقع الحصرية الوحيدة (غير متكررة في الناقل) والتي تُستعمل لقطع الناقل ولصق الـDNA المنقول.

تحتوي البلازميدات المُصممة للاستعمال العام على نظام يُسهل عملية تشخيص الخلية التي تحتوي على DNA منقول، وذلك بناء على تعطيل صفة ظاهرية (سهلة التشخيص) عند لصق الـDNA المنقول. ومن أكثر الأنظمة استعمالاً هو نظام مورث "لاك 'Z" (Lac Z') الذي يحمل شفرة الـα-peptide من الطرف النتروجيني (N-terminus) لأنزيم تحليل الكالاكتوز أو β–كلتاكتوسيدايز (β-galactosidase) لبكتيريا *E-coli*. إن بناء هذا البيتايد (Peptide) من جين يقع على الناقل يُكمّل أنزيماً خاملاً (Inactive) موجوداً في الخلية مسبقاً، وتقع شفرته على كروموسوم الخلية المضيفة. بالنتيجة هناك تفعيل لنشاط أنزيم β–كلتاكتوسيدايز (β-glactosidase) الذي يمكن كشفه من خلال قدرته على إنتاج مادة زرقاء اللون (Blue chromophore) من مادة أولية غير ملونة هي 5-5bromo-4chloro-3indolyl β-galactoside أو اختصاراً X-gal. إن لصق قطعة DNA في هذا الناقل في الجين المُنتج للـα-peptide يمنع تكوينه، وبالتالي يمنع تنشيط β-glactosidase. فإذا ما أضيفت المادة الأولية X-gal إلى أطباق الهلام الغذائي الانتقائية (أغار Agar)، فإننا سنحصل على مستعمرات بكتيريا زرقاء، هذا دليل على عدم وجود DNA منقول (أي إن α-peptide تم إنتاجه)، أما إذا كانت المستعمرات بيضاء اللون فهذا دليل على وجود قطعة DNA منقولة ضمن مُورِّث α-peptide. يُستعمل نفس نظام الكشف هذا في العديد من الملتهمات الحديثة، حتى في الملتهمات التي تؤدي إلى صفائح فيروسية زرقاء أو بيضاء. من أكثر ملتهمات الاستعمال العام هناك مجموعة الـpUC (الشكل 12.4).

2.5.4 ملتهم بكتيري ناقل وكوزميد ناقل
Bacteriophage and cosmid vectors

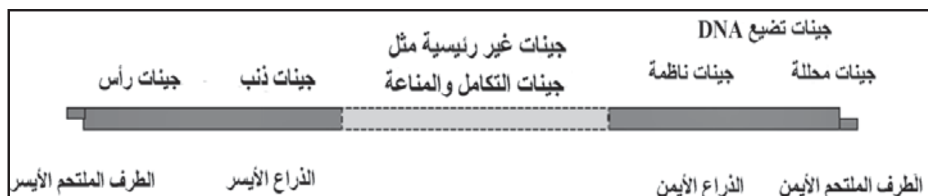
إن الملتهم البكتيري λ المُمرِض لبكتيريا E.coli هو الأكثر استعمالاً كناقل عام الاستعمال وهو الأساس لأكثر الملتهمات استعمالاً. ظهرت أهمية الملتهم الناقل λ

نظراً إلى قدرته على انتساخ قِطع DNA يزيد طولها على 10 kbp، يصعب نقلها بواسطة بلازميدات الاستعمال العام. يتكون جينوم الملتهم λ من حوالى 48.5 kbp ويمتلك أطرافاً ناتئة لجهة ´5 طولها 12 قاعدة نيوكليوتيدية، عندما تلتصق هذه الأطراف يتحلق (يصبح دائرياً) جينوم الملتهم في الخلية المضيفة بعد إمراضها. تسمى الأطراف الناتئة القابلة للصق بموقع cos (Cos Site) أو (Cohesive ends). أثناء عملية تطوير الناقل λ تم إدخال تغييرات كإزالة جزء غير ضروري من الجينوم وذلك لإفساح المجال لقطعة أكبر من الـــDNA المراد نقله بالالتحام، نتيجة لهذا التغيير يصل طول قطعة الـــDNA المراد نقلها إلى 23 kbp. وبما أن جينوم الملتهم λ يأخذ الشكل الدائري بعد إصابة الخلية المضيفة، فإنه من الممكن أن يتوفر تجارياً كقطعتين منفصلتين، ذراع أيمن وذراع أيسر، كلٍّ على حدة، ويتميز كل ذراع بموقع قطع بالأنزيمات الحصرية مختلف عن الآخر، ما يسمح بإلصاق طرفي قطعة الـــDNA المنقولة مع هذين الذراعين (الشكل 13.4). إن تحويل البكتيريا بجينوم الملتهم λ محدود الفعالية، لذلك تم تطوير نظام تغليف للـــDNA بهدف تسهيل دخول جينوم λ المأشوب إلى الخلية البكتيرية المضيفة.



الشكل 12.4: الناقل البلازميدي للاستعمال العام المسمى pUC19 الذي ينتمي إلى عائلة النواقل pUC. تم تصميم النواقل في مجموعة pUC على شكل أزواج يختلف الواحد عن الآخر فقط بانعكاس (opposite orientation) اتجاه تموضع الـــ MCS (تجمع الأنزيمات الحصرية ذوات المواقع الوحيدة في الناقل) فبذلك تسمح للـــDNA المنقول أن يُلصق بأحد الاتجاهين، موافقاً أو

معاكساً لاتجاه نسخ المورث LacZ. يرمز السهم على LacZ وعلى جين مقاومة الأمبيسيلين (AP^R) وعلى مورث بروتين التضاعف (Ori) إلى اتجاة النسخ. مواقع قطع الأنزيمات الحصرية مبينة بحروف كبيرة وصغيرة، كما تُبين تسلسل الأحماض الأمينية بعد الترجمة.



الشكل 13.4: خريطة مبسطة لجينوم فايج λ يبين الذراع الأيمن والأيسر والمنطقة الوسطى التي أزيلت من ناقل الانتساخ λ.

يجمع الكوزميد الناقل Cosmid Vector بين إيجابيات الملتهم الانتساخ البلازميدية (من سهولة الانتساخ والمضاعفة والانتشار) مع إيجابيات الملتهم الناقل لجهة الكفاء العالية في الدخول للبكتيريا المضيفة وقدرته على نقل جزيئات كبيرة من الـــDNA. يحتوي الكوزميد الناقل على بلازميد أضيفت إليه الأطراف cos (cos site) القابلة للصق، من جينوم λ. يُمكِّن وجود مواقع الـــcos من استعماله بنفس طريقة التغليف في الزجاج (*in vitro*) المُعتَمدة للملتهم λ. يعني ذلك إمكانية دخول الناقل، مع قطعة DNA منقولة حجمها كبير، بشكل فعال إلى داخل خلية *E. coli* المضيفة المناسبة. بما أن حجم الكوزميد الناقل هو 5 kbp فإن بإمكانه استقبال قطعة DNA منقولة يتراوح طولها بين 32 و 47 kbp. بعد تغليف الكوزميد الناقل بغلاف فيروسي (في الزجاج *in vitro*) يتم إدخاله إلى داخل البكتيريا كما لو كان جسيماً ملتهماً λ، ثم يأخذ شكلاً دائرياً ويبدأ عملية التضاعف باستعمال وظيفة التضاعف للبلازميد.

3.5.4 كروموسومات بكتيرية إصطناعية

Bacterial artificial chromosomes

تم تطوير كروموسومات بكتيرية إصطناعية (رمزها pBAC، حيث تعني الـــp بلازميد) من أجل انتساخ قطع DNA كبيرة (أكبر من 50 kbp). تم تصميم الناقل BAC انطلاقاً من البلازميد F الموجود في الـــ *E. coli* ، لدى هذا الناقل القدرة على تقبُّل قطعة DNA كبيرة قد تصل إلى 300 kbp. تبقى نسخة واحدة

من الملتهم pBACs في البكتيريا، حيث يُمنع مضاعفة أكثر من pBAC واحد في نفس الخلية المضيفة. يمكن استخدام الـــpBAC لبناء مكتبات مرتبة للجينوم البكتيري حيث تحتوي مجموعة من النسائل (Clones) على كامل الجينوم بشكل قِطع من الـــDNA متداخلة (Overlapping) وملصقة بالناقل.

4.5.4 نواقل لأهداف خاصة Special purpose vectors

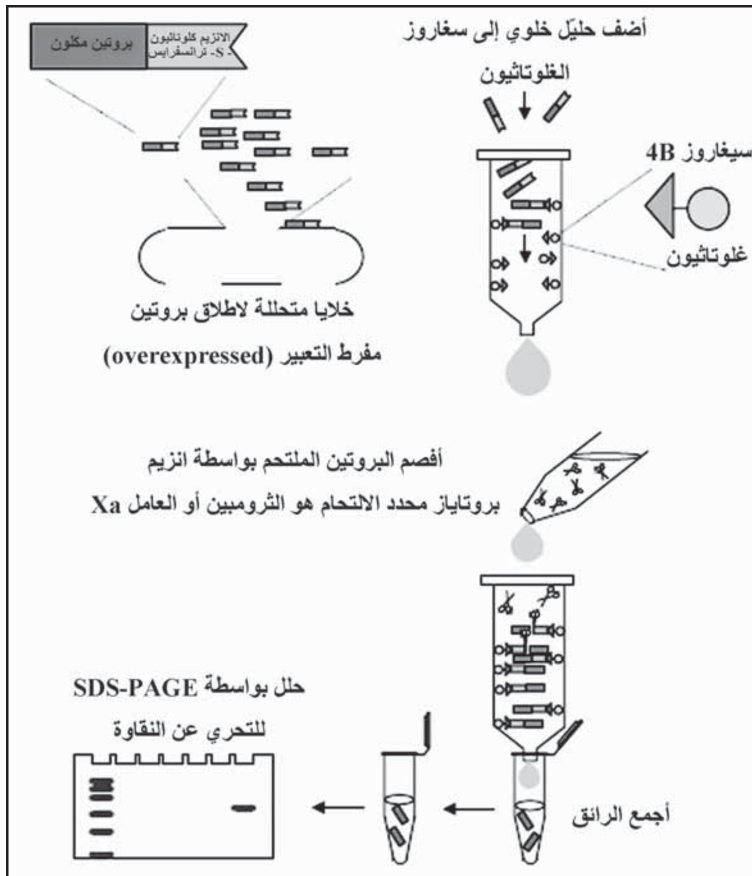
بالإضافة إلى النواقل التي تم عرضها سابقاً، فقد تم تطوير عدد من الملتهمات لأهداف خاصة مختلفة، نذكر منها ما يلي باختصار.

النواقل التعبيرية Expression vector

صممت هذه النواقل بهدف إنتاج عال ومنظم لجين مستهدف، بحيث يتم إنتاج البروتين بنسبة عالية تصل إلى 40% من محتوى البروتين في الخلية. في هذا النوع من النواقل (الملتهمات) يتم عادة إضافة مؤشر أو علامة للتآلف (Affinity tag) فيها كي تُسهل عملية عزل البروتين الناتج بطريقة كروموترغرافية التآلف (Affinity chromatography). بنيت نواقل التعبير على أساس بلازميد في الغالب، ويُستخدم خلال التعبير أنزيم بلمرة الـــRNA من ملتهم T_7 (T_7 RNA polymerase) القوي والخاضع للضبط. يتم لصق أو دمج الجين المستهدف في موضع يتلو (Downstream) أنظمة ضبط من ملتهم T_7، أي التسلسل الضابط لنسخ الـــRNA (RNA Promoter) وللترجمة (موضع اتصال الريبوسوم Ribosome binding site). يدخل هذا الناقل بكتيريا *E. coli* التي تحمل على كروموسومها نسخة من المورث المسؤول عن أنزيم بلمرة الـــRNA العائد الملتهم T_7. عند تنشيط جين أنزيم بلمرة الـــRNA العائد إلى الملتهم T_7، تقوم عندها الخلية بإنتاج الجين المستهدف الواقع أسفل المحرك (Promoter).

أما إذا كان الجين المستهدف غير متصل بإشارة تآلف فإن وسائل الاستخلاص والتنقية تكون باهظة التكلفة. ولذلك تم تطوير عدد من منظومات إشارات التآلف المختلفة في السنوات القليلة الماضية، وذلك بهدف تـــنقية البروتين الناتج بشكل دقيق. ومن بين إشارات التآلف العديدية هناك الإشارة المؤلفة من ستة جزيئات هستدين

(Histidine أو 6xHis) التي بدورها ترتبط بالنيكل (Nickel) وبأنزيم غلوتاثيون–S–ترانسفرايز (Glutathione-S-Transferase) الذي يتصل بمرمكب غلوتاثيون (Glutathione). يتم وصل الــligand (مثلاً الغلوتاثيون) بمادة "راتينجية" (Resin) غير قابلة للذوبان في عامود كروماتوغرافي. ثم يُمرَّر مزيج البروتينات المستخلصة الذي يحتوي على البروتين المُستهدف متصلاً بإشارة التآلف (الشكل 14.4). يحتفظ العمود الكروماتوغرافي بالبروتين المُستهدف بينما تخرج كل البروتينات الأخرى. ثم يتم استخراج البروتين المستهدف بطريقة الشطف Elution ما يمكننا من الحصول عليه نقياً في أنبوب. بعد ذلك يمكن إزالة إشارة التآلف من البروتين بطريقة كيميائية أو بتفاعل أنزيمي محلل للبروتين (Protease).



الشكل 14.4: استعمال أنزيم غلوتاثيون–S–ترانسفرايز (Glutathione–S–Transferase GST)) كإشارة تآلف في تنقية البروتين. يُصنع البروتين متحداً مع GST من الطرف N

(N–terminus). بعد تكسير وتحلل الخلية المنتجة للبروتين المدمج مع المؤشر GST، يُمرر ناتج التكسير الخلوي عبر عمود من السفروز الملصق عليه غلوتاثيون (Sepharose Glutathione). يعلق البروتين–المؤشر بفضل الاتصال بين GST و غلوتاثيون وتخرج باقي البروتينات. بعد عملية غسل مستفيضة للعمود، يتم إطلاق البروتين المقصود من العمود عبر قطع الإشارة باستعمال أنزيم تحليل البروتين Protease، الذي يفصل البروتين عن الــGST.

النواقل الإفرازية Secretion vectors

إن معظم أنظمة إنتاج البروتين المأشوب تقوم بمراكمة المُنتَج البروتيني داخل الخلية، هذا ما يسبب خفض مستوى الإنتاج أو تكتل البروتينات (Protein aggregation) مع بعضها البعض أو تحلُّلها (Proteolysis) وبالتالي فقدان النشاط الحيوي للبروتين نهائياً (الفقرة 4.9.4). يمكن أحياناً تجاوز هذه الصعوبات عن طريق إفراز البروتين مباشرة إلى الوسط الغذائي خارج الخلية، بدلاً من تراكمه في داخلها، وبذلك يُتاح له أن يتراكم بتركيز أعلى ويكون التفاف البروتين طبيعياً صحيحاً. وللتمكن من إفراز البروتين للوسط الغذائي الخارجي لا بد من توجيهه إلى جهاز الإفراز الموجود في الغشاء السايتوبلازمي للخلية. ويقتضي ذلك استعمال ناقل الإفراز (الشكل 15.4) الذي يؤدي إلى التحام البروتين مع إشارة الإفراز على طرف N (N-terminus) التي تسمى إشارة ببيتيد على طرف N (N-terminal Signal peptide). تقوم هذه الإشارة بتوجيه البروتين نحو جهاز الإفراز ترانسلوكايز (translocase) الموجود على الغشاء السايتوبلازمي. عند خروج البروتين من الخلية يتم قطع ببتايد الإشارة بواسطة أنزيم خاص على السطح الخارجي للغشاء الخلوي اسمه signal peptidase.

الناقل المكوكي أو ثنائي الوظيفة Shuttle or bifunctional vectors

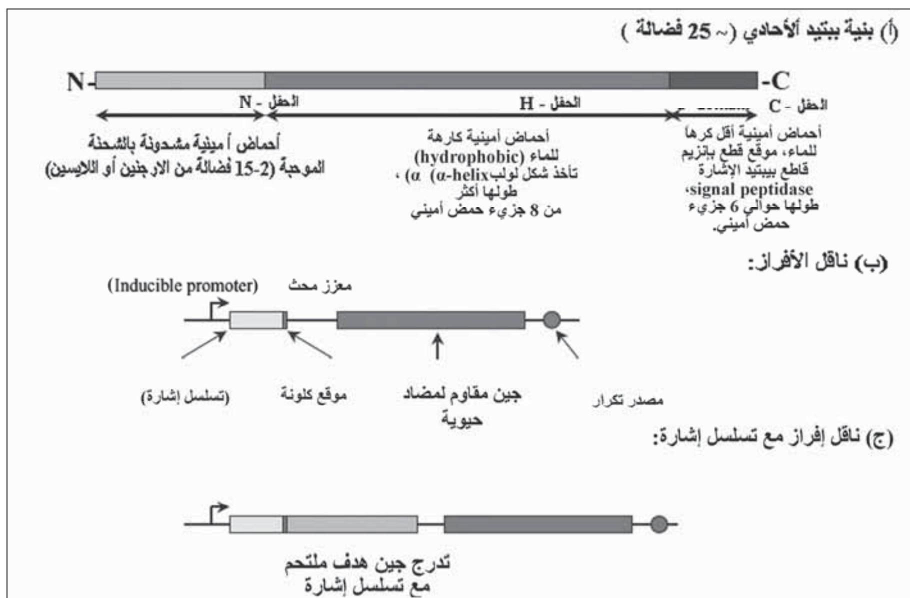
إن التقدم السريع في علم الوراثة الجرثومية وتطوير الملتهم انتساخ فتحا الباب أمام التلاعب بالجينوم عند طيف واسع من الكائنات المجهرية. ولكن الكفاءة أو الفعالية الضعيفة لعملية التحويل (إدخال الناقل إلى الخلية المضيفة) تُحتِّم استعمال بكتيريا E. coli كخلية مضيفة وسيطة (مؤقتة) للانتساخ. لهذا الهدف

تُستعمل الملتهمات المكوكية وثنائية الوظيفة التي تتميز بنقاط بدء التضاعف (Replication origins) الفعالة في كل من الــE. coli والكائن المجهري المُستهدف (Target microorganism). تم مؤخراً اكتشاف بلازميدات ذات قدرة على التضاعف في عدد كبير من أنواع الكائنات المجهرية وتم استعمالها لبناء أجيال جديدية من البلازميدات المكوكية.

النواقل أحادية الجدلة والناقل فاجمايد

Single-stranded phage and phagemid vectors

تقتضي التجربة أحياناً استعمال DNA أحادي الجدلة، وخاصة عند إحداث الطفرات الموجهة لموقع باستعمال أوليغونيوكليوتايد (Oligonucleotide-directed mutagenesis). قام "ميسنغ" (Messing) بتطوير مجموعة من الملتهمات النواقل إنطلاقاً من الملتهم M13 الخيطي أحادي الجدلة الخاص عند بكتيريا *E. coli*. تحمل مجموعة mp من الملتهم M13 الــMCS (مواقع الانتساخ المتعددة) في سلسلة الشفرة المسؤولة عن البيبتيد α (α-peptide) المكمل لأنزيم β كالاكتوسيداز

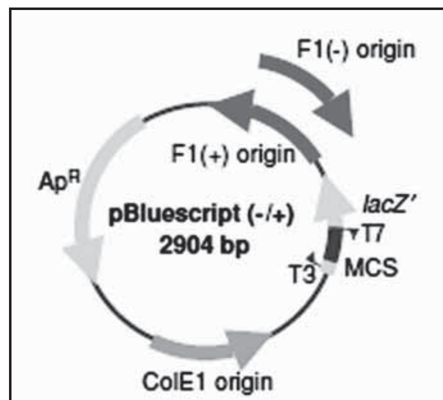


الشكل 15.4: مميزات نواقل الإفراز. (أ) بُنية إشارة ببتيدية signal peptide (أو قائد ببتيدي) نموذجية في بكتيريا الــ E. coli، تقود هذه الإشارة البروتين المصنع إلى الغشاء

الخلوي . (ب) تنظيم بُنية ناقل الإفراز يُظهر مواقع انتساخ (لصق الــDNA المنقول) تالية مباشرة للتسلسل المسؤول عن الببتيد القائد. (ج) ناقل إفراز يبين وجود الــDNA المنقول المسؤول عن البروتين المستهدف مندمجاً مع اشارة الإفراز (تالياً لها مباشرة) وذلك في الإطار الصحيح للترجمة (in–frame).

(β-galactosidase). وبذلك يمكن انتقاء الملتهم الذي دمج مع DNA بناء على لون الصفيحة الفيروسية زرقاء أو بيضاء (الفقرة 1.5.4). تُمرض وتُصيب مجموعة الملتهمات المشتقة من الــM13 سلالات من الــ *E. coli* من نوع F^+ أي التي تملك شعيرات على سطحها نوع F (F pilus). ويتم استعمال الناقل في عمليات الكلونة بشكله ثنائي الجدلة (dsDNA) القابل للمضاعفة (Replicative).

يحتوي الفاجميد أو الفازميد (Phagemid or Phasmid) على موقع بدء المضاعفة (Replication origin) لملتهم أحادي الجدلة (الشكل 16.4)، عادة ما يكون ملتهم f1 الشديد التشابه مع الملتهم M13. تقوم بكتيريا *E. coli* بالمحافظة على الفاجميد بشكل ثنائي الجدلة dsDNA بفضل موقع بدء تضاعف (Replication origin) المأخوذ من البلازميد. ولكن إذا أصيبت البكتيريا بالملتهم المساعد f1 فإن موقع بدء المضاعفة (Replication origin) في f1 سيبدأ بالعمل بحيث يتحول الملتهم إلى سلوك طريق المضاعفة لانتاج DNA أحادي الجدلة ssDNA الذي يتم تغليفه ضمن جزيئات الملتهم ويطرح خارج الخلية.



الشكل 16.4 : الفاجميد pBluescript هو ناقل بلازميدي يساعد في تصنيع DNA أحادي الجدلة. تتم إصابة الخلايا الحاوية على فاجميد بملتهم f1 مساعد (f1 helper)، هذا ما يُحفز موقع بدء

التضاعف f1 ويُنتِج DNA ذو جدلة واحدة يتم تغليفه في جسيم الملتهم ثم يطلق خارج البكتيريا. هناك نوعان من الفاجميد pBluescript وهما (+) و (−) التي تسمح لعملية التضاعف أن تكون على جدلة أو على الأخرى بحسب الطلب. ترمز (−) إلى الجدلة المكملة (complementary) للـــRNA الرسول، بينما ترمز إشارة (+) إلى الجدلة الأخرى المطابقة له. يقع محركا الملتهمتين T3 و T7 على طرفي الـــMCS بحيث يمكن نسخ إحدى جدلتي الـــDNA في الزجاج بواسطة استعمال أنزيم بلمرة الـــRNA المناسب والمواد الأولية الضرورية (NTP). يساعد مورث مقاومة الأمبيسيلين على انتقاء البكتيريا التي تحتوي على الناقل، كما يساعد في المحافظة على استقرار الفاجميد في خلية E. coli. تشير الـــorigin إلى موقع بدء المضاعفة.

ناقلات التكامل Integration vectors

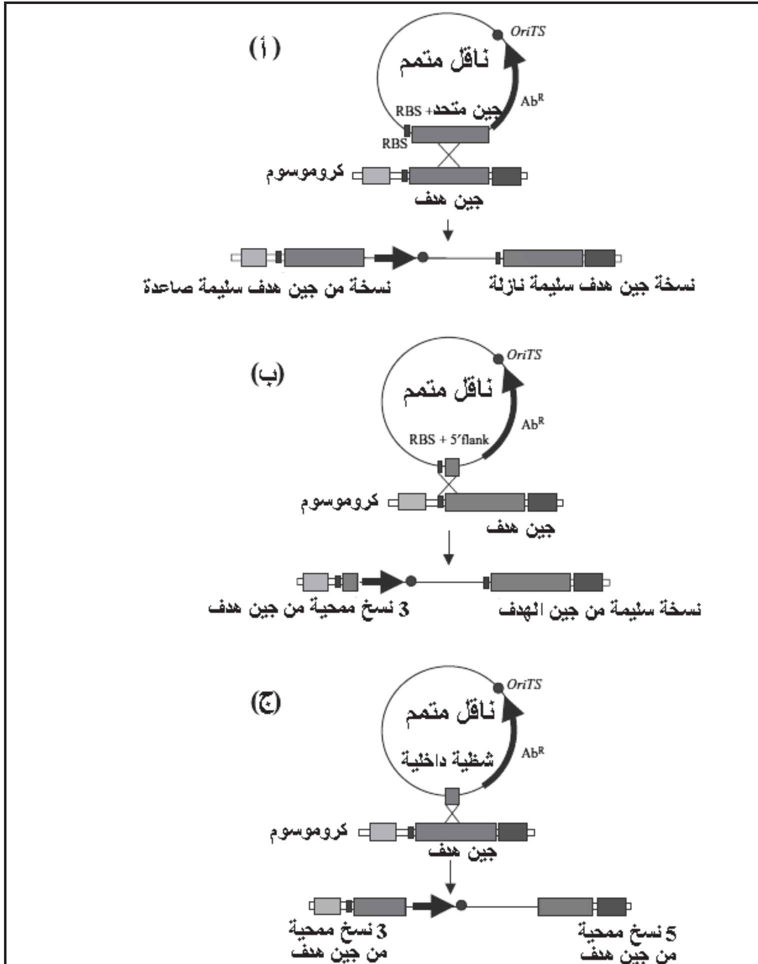
صُمِّمت هذه الملتهمات لتندمج جزئياً أو كلياً في كروموسوم البكتيريا المضيفة. تُستعمل هذه الملتهمات في دراسات كلونة خاصة ومختلفة، منها انتساخ الجينات الموجودة بعدد نُسخ قليلة (Low copy number) ، وتُستعمل كذلك لإنتاج طفرات إقحامية (Insertion mutation) واستبدال الجينات وإجراء صهر جيني (Gene fusion). تشتق الملتهم الاندماج عن بلازميد خاص، إما أن يكون غير قادر على التضاعف في المضيف، أو يحتوي على طفرة تجعل التضاعف حساساً للحرارة. ويتم اندماج هذه الملتهمات نتيجة عملية تأشيب تقاطعي (عبور) منفرد أو مزدوج (Single or double Cross-over recombination) وذلك باستخدام تجانس وتشابه التسلسل للـــDNA على الناقل وعلى الكروموسوم.

في حالة التأشيب التقاطعي المنفرد (Single cross-over recombination) الذي يُعرف أيضاً بنمط "كامبيل" للاندماج (Campbell-type Integration)، حيث يتم اندماج كامل جزيء الناقل في كروموسوم الخلية المضيفة. يحصل هذا الاندماج بعملية تقاطع بين تسلسل محدد على الناقل متجانس (متشابه) مع تسلسل آخر على كروموسوم الخلية. إن احتمال (تردد) الاندماج يختلف من خلية مضيفة إلى أخرى، لذلك قد يتوجب نمو الخلية المضيفة مع الناقل لأجيال عديدة كي يتسنى حصول الاندماج. للتمكن من ذلك، تُعتمد للنمو درجة حرارة تسمح بتضاعف الناقل. يتم بعد ذلك انتقاء الخلية التي تم الاندماج فيها عن

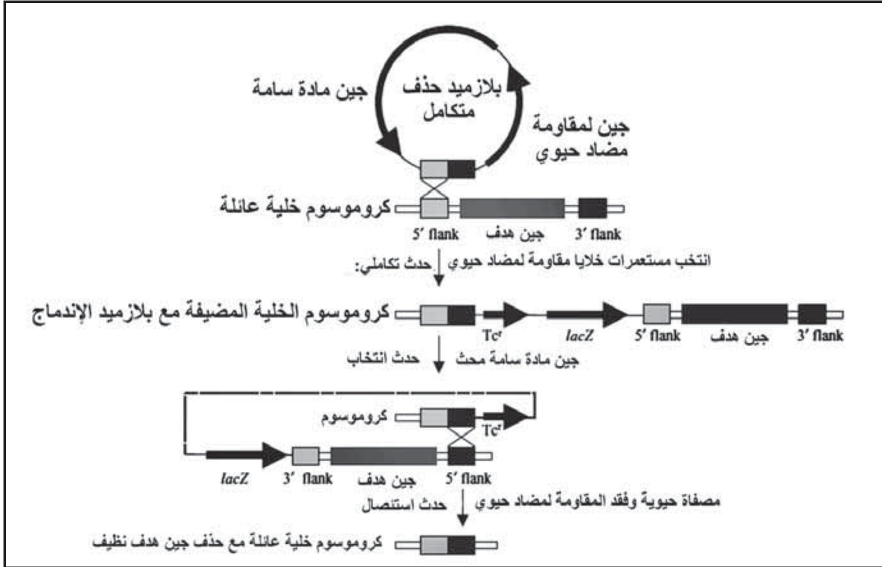
طريق رفع درجة الحرارة إلى درجة لا تسمح بمضاعفة الناقل، بالإضافة إلى زيادة المضاد الحيوي إلى الوسط الغذائي. في هذه الظروف تكون الخلية المقاومة للمضاد الحيوي هي التي تم فيها الاندماج، إذ إن الناقل غير المندمج يختفي على تلك الحرارة نظراً إلى عدم حصول التضاعف. ويمكن التأكد من حصول الاندماج المطلوب وصحته بتقنيه الــPCR باستعمال بادئ التفاعل مصمم لمنطقة الكروموسوم المجاورة للــDNA المُقحَم وموجه نحوه (نحو الــDNA المُقحَم)، وبادئ تفاعل آخر للــDNA المُقحَم وموجه نحو الــDNA المجاور. إن النتيجة المتوخاة من اندماج الناقل مع كروموسوم الخلية بالتأشيب التقاطعي المنفرد (Single cross-over recombination)، لجهة فاعلية الجين المُستهدف، تعتمد على قِطع الــDNA المتجانسة (المتشابهة) المنتسخة والمحمولة في الناقل نفسه (Homologous fragment cloned into the vector). وإذا كان الجين المنقول كاملاً غير منقوص (التسلسلات المتجانسة على أطرافه)، فلن نحصل بعد الاندماج على نسختين عاملتين من المورث على الكروموسوم (الشكل 17.4 (أ)). وإذا كانت قطعة الــDNA المنقولة تحمل التسلسل المتجانس على أحد طرفي الجين فقط، فستكون نتيجة الاندماج نسخة واحدة فعالة، والثانية تكون ممحوة عن الكروموسوم (الشكل 17.4 (ب)). أما إذا كانت قطعة الــDNA تحتوي على تسلسلات متجانسة داخلية في المورث المستهدف (ليست على أي من الأطراف) فلن نحصل على نسخة فعالة من الجين على الكروموسوم (الشكل 17.4 (ج)).

من الاستعمالات المتخصصة للتأشيب التقاطعي المنفرد (Single cross-over recombination) نذكر عملية المحو النظيف (Clean deletion) ، كما في الشكل 18.4) حيث تتم إزالة تسلسل محدد من الكروموسوم بدون أن يحل مكانه أي تسلسل آخر أو مؤشر (Marker). يتم انتساخ التسلسلين الموجودين على طرفي المورث في الناقل، ثم يُجرى التحويل (Transformation)، يتلو ذلك انتقاء الخلايا التي تم فيها الاندماج بالتأشيب التقاطعي المنفرد. وبالرغم من أن الشكل 18.4 يبين أن الطرف ´5 هو الذي قام بالعملية، فإن الشيء ذاته يحصل على الطرف ´3 وبنفس

الفعالية. وفي المرحلة الأخيرة يتم انتقاء الخلايا التي حصلت فيها عملية استقطاع (Excision) بين الطرفين اللذين لم يتدخلا في عملية التأشيب التقاطعي – في المثال المبين في الشكل 18.4 بين أطراف ´3. يمكن انتقاء الخلايا التي حصلت فيها عملية المحو (Deletion) إذا كان الناقل يحمل مورثاً مُنتِجاً لمادة سامة، وبالتالي تموت الخلايا التي لم يتم المحو فيها والتي لا زالت تحمل الناقل.



الشكل 17.4 : نتيجة التأشيب التقاطعي المنفرد باستخدام ناقل اندماج وقطعاً جينية مختلفة. (أ) قطعة تحمل الجين الكامل، وتتضمن موقع ارتباط الرايبوسوم. (ب) منطقة الطرف ´5 وموقع ارتباط الرايبوسوم. (ج) قطعة داخلية. AbR= جين المقاوم للمضاد الحيوي الأمبيسلين. OriTS موقع بدء المضاعفة الحساس لدرجة الحرارة: RBS موقع ارتباط الرايبوسوم.

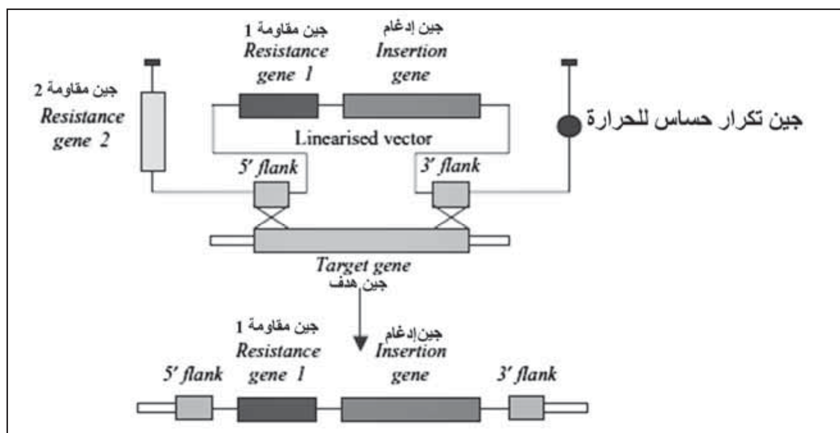


الشكل 18.4: عملية محو نظيف في الكروموسوم (clean chromosome deletion) باستخدام ناقل اندماج الذي يحمل شفرة منظومة الاختيار السلبي (negative selection System)

وعلى عكس حالة التأشيب التقاطعي المنفرد، فإن التأشيب التقاطعي المزدوج والمعروف باسم Allele replacement أو استبدال الـــ"الأليل" (أو الفردة) يؤدي إلى نسخه واحدة من الـــ DNA المستهدف. عادة ما يتم في هذه التقانة استبدال تسلسل DNA من الكروموسوم بتسلسل DNA آخر متجانس (Homologous) يحمل طفرة معطِّلة، أو مختلف (Heterologous DNA). يتم دمج تسلسلين (في ناقل الاندماج) مشابهين مع التسلسلين على طرفي قطعة الكروموسوم المستهدفة. فيتم استبدال جزئي أو كلي (لتسلسل الجين المراد تبديله) بمورث مؤشر (Marker gene) أو بمورثات أخرى عند الحاجة. وعند حصول تأشيب تقاطعي مزدوج بين الكروموسوم وناقل الاندماج، ينتج من ذلك دمج التسلسل الموضوع بين الطرفين (Flanking region) كما يبين الشكل 19.4.

إن خطوة قطع الناقل قبل عملية التحويل وجعله خطَي الشكل يساعد على انتقاء الخلايا التي تم الدمج فيها بالتأشيب التقاطعي المزدوج مع الكروموسوم لأن حالة الدمج بالتأشيب التقاطعي المنفرد تؤدي إلى صفة قاتلة للمضيف. يمكن التأكد

من غياب الناقل الأصلي من خلال فقدان صفة المقاومة للمضاد الحيوي التي يحملها الناقل في قطعة الـــDNA التي لا تدخل في الاندماج.



الشكل 19.4: التأشيب التقاطعي المزدوج لاستبدال الفردة (Double cross-over recombintion for allele replacement recombination)

5.5.4 مكتبات الجينوم ومكتبات الجين Genomic and gene libraries

المكتبة الجينومية هي عبارة عن مجموعة نسائل (Clones) مأشوبة تحتوي نظرياً على جزيئات تُمثل كل المورثات المشفرة في جينيوم كائن حي. أما من الناحية العملية فإن المسألة تعتمد على احتمال (Probability) بأن تكون قطعة معينة من الجينوم (أو جين معين) موجودة في المكتبة، ونسعى إلى أن يكون الاحتمال أكثر من 95%. تُنتَج المكتبات بطريقة عشوائية تُعرف بالكلونة العشوائية (Shotgun cloning)، أي عن طريق تحضير قطع DNA عشوائية ووضعها في ناقل معين، تُحضَّر تلك القطع العشوائية بطريقة ميكانيكية أو هضم أنزيمي. كما يمكن تحضير المكتبات عن طريق توليد قطع من الـــDNA تم نسخها العكسي بواسطة أنزيم النسخ العكسي (Reverse transcriptase) وبالاعتماد على الـــRNA الرسول المستخرج من نسيج معين أو من كائن حي محدد.

6.4 تحليل الجينوم والبروتيوم Analysis of genomes/proteomes

تقع مادة المعلومات الوراثية لخلية البكتيريا على الكروموسوم أو الكروموسومات. إن منظومة كروموسومات البكتيريا هي أكثر اختلافاً مما توقعه

العلماء. وقد تم اكتشاف أشكال خيطية ودائرية للكروموسومات من خلال تقانات رسم الخرائط الفيزيائية (Physical map) للكروموسومات كتقانة الرحلان الكهربائي في الحقل النبضي (pulsed-field gel electrophoresis أو PFGE) وتقانة سَلسَلة الــDNA.

1.6.4 بصمة الــDNA / الخرائط الفيزيائية/الرحلان الكهربائي في حقل نبضي DNA Finger Printing/Physical mapping/Pulsed-field gel electrophoresis

قبل التمكن من دراسة التسلسل لكل الجينوم، تم تطوير طرق متنوعة لتحديد البُنية الفيزيائية للجينوم البكتيري وبهدف تحديد درجة القرابة بين سلالات البكتيريا، ما يشكل أهمية بالغة في الكشف عن هوية البكتيريا في دراسات علم الأوبئة.

يمكن بناء الخريطة الفيزيائية للكروموسوم باستعمال تقانة الــPFGE، التي تم تطويرها لدراسة وفصل قطع DNA كبيرة جداً (بين 30 kbp إلى 2000 kbp) عن بعضها البعض. ومن أجل تفادي التكسير الميكانيكي لقطع الــDNA الكبيرة فقد تم تطوير طريقة يتم فيها استخراج الــDNA من البكتريا ضمن كتلة من هلام الأكاروز (Agarose blocks)، وعند الحاجة يتم هضم وتقطيع الــDNA في موقعه (in situ) باستعمال أنزيمات حصرية لا تقطع إلا نادراً (من 10 إلى 30 مرة). بعد ذلك تؤخذ كتلة الأكاروز تلك وتُدمج في هلام الأكاروز (Agarose)، ثم يُصار بعد ذلك إلى الرحلان الكهربائي في حقل متذبذب (Oscillating electric field). يعتمد فصل الجزيئات عن بعضها البعض على الوقت الضروري لكل جزيء DNA لتعديل اتجاه مساره بناء على الحقل الكهربي المتغير، تأخذ الجزيئات الكبيرة وقتاً أطول وبالتالي يكون رحلانها أبطأ. يتم صّف (Alignment) الجزيئات بعدة استراتيجيات، منها قطع الــDNA بأنزيمين ذوي مواقع قطع نادرة، والتهجين بين جزيئات (بعد عزلها) ناتجة من عمليات قطع مختلفة، وتحويل (Transformation) بكتيريا حاملة لطفرة ما بِقِطَع الــDNA الناتجة وذلك بعد تنقيتها.

تم تطوير طرق تحديد البصمة الجينومية لاختبار العلاقة بين السلالات البكتيرية المختلفة وذلك ضمن الدراسات الوبائية (كمراقبة ظهور الأوبئة) ودراسة

الاختلافات الطبيعة بين الأفراد (Heterogeneity in natural populations) .
يُعتمد نمط الشرائط (Banding pattern) المكون من قطع DNA المختلفة الطول لتشخيص الأمراض ودراسة التشابه بين السلالات. ونمط الشرائط هذا ناتج من عملية هضم أو قطع الـــDNA بالأنزيمات الحصرية (Restriction fragment length polymorphism) أو RFLP، أو عن طريق التضخيم بالـــPCR (Amplified fragment length polymorphism أو AFLP) باستعمال بادئات تفاعل خاصة، أو عن طريق التضخيم بالـــPCR (Randomly amplified polymorphic DNA أو RAPD) باستعمال بادئات تفاعل ذات تسلسل عشوائي.

2.6.4 تحليل البروتيوم (كل بروتينات الخلية)

Analysis of the proteome

يعني اصطلاح البروتيوم مجمل بروتينات الكائن الحي التي يُشفرها الجينوم. تكشف دراسة البروتيوم عن العلاقة بين مورثات كائن حي وفسلجة وظائفه. كما تساعد أيضاً على التثبت من سَلسَلة الجينوم واكتشاف تجمعات المورثات ذوات الضبط المشترك أو (Regulons)، أي مجموعة الجينات والأبرون الخاضعة لنفس البروتين الضابط (Regulatory proteins)، وكذلك المورثات ذوات التحفيز المشترك أو (Stimulons) التي تُحفَّز بنفس الإشارة، فهي تساعد إذاً على تقييم تفاعل الكائن الحي مع محيطه. تملك بكتيريا الـــ*E. coli* جينوماً حجمه 4.6 Mbp، ويُشفِّر حوالى 4400 بروتين. ومن خلال معلومات من التجارب المخبرية ومن خلال دراسة مقارنة لتماثل تسلسل البروتينات تم تحديد وظيفة حوالى 60% من تلك البروتينات. أما الدور الحيوي لما تبقى من البروتينات (حوالى 1800) فهي لازالت غير معروفة، ولكن البحث لا يزال مستمراً في هذا الشأن. نجد نفس النسبة تقريباً من البروتينات المجهولة الوظيفة في كائنات أخرى تملك جينوماً أصغر بكثير من جينوم الـــE. coli مثل مايكوبلازما جينيتاليوم *(Mycoplasma genitalium)* ذات جينوم بحجم 0.58 Mbp.

يمكن تشخيص وقياس كمية بروتين محدد بطريقة "وصمة ويسترن" أو Western blotting إذا توفرت أمصال مضادة لها (Antisera)، حيث يتم فرز البروتينات بعضها عن بعض (بعد استخراجها من الخلية) بالرحلان الكهربائي في هلام من البوليأكريلاميد مع الـــSDS -Sodium dodecyl sulphate) polyacrylamide gel electrophoresis) ويختصر بـــSDS-PAGE، تُنقل البروتينات بعد ذلك من الهلام وتُثبَّت على غشاء من نايتروسللوز (Nitrocellulose) أو نايلون (Nylon). ثم يتم تشخيص البروتين المحدد باستخدام مصل مضاد (مثل المسبار) والذي يتم كشفه بواسطة مصل ثانوي مضاد موسوم (Labeled secondary antibody).

إن الطريقة الأفضل لدراسة البروتيوم هي عبارة عن مزيج من تقنيتين مهمتين الأولى هي الرحلان الكهربائي ذي البعدين أو الاتجاهين (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis أو 2-DPAG) ، والثانية التشخيص والكشف عن هوية البروتينات بتقانة قياس الكتلة الطيفي (Mass Spectrometry). تسمح تقانة 2-DPAG بفصل مئات البروتينات المستخلصة من الخلية عن بعضها البعض. يتم أولاً فرز البوليببتيدات بالاتجاه الأول على لوحة من الأكرلمايد تحتوي على تدرج في درجة الحموضة (pH gradient) حيث تُفصل البروتينات بناء على pI وهي نقطة تَسَاوي الشحنات (Isoelectric point)، مما يؤدي إلى فرز البوليببتيدات حسب شحناتها. بعد ذلك توضع اللوحة (الناتجة من الرحلان الأول) في هلام آخر لإجراء الرحلان الكهربائي SDS-PAGE بالاتجاه الثاني حيث تُفرز الجزيئات حسب أحجامها. إن رحلان البوليببتيدات في الهلام يتكرر (Reproducible) بشكل جيد خلال التجارب. ويمكن التعرف على بوليببتيد محدد باستعمال أصباغ معينة أو مواد مشعة واسمة في حمض أميني مع تصوير شعاعي. يمكن مطابقة النتائج ومقارنتها بعدة هلامات باستعمال برامج حاسوبية للمطابقة (Warping software) وذلك بهدف دراسة التغييرات الحاصلة في إنتاج بعض البروتينات نتيجة ظروف نمو خاصة، أو ضغط معين، أو تغيير في بعض المواد الأولية الغذائية. كما يمكننا أن نقوم بقطع بقعة بروتين معين من الهلام وهضمها بأنزيم التربسين، ثم فحصها لتحديد هويتها بتقانة قياس الكتلة الطيفي (Mass

spcetrometry) ذات الدقة عالية، على سبيل المثال Matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDT-TOF أو Electro-spray mass spectrometry.

7.4 تحليل التعبير الجيني Analysis of gene expsession

يقوم المُحرك (Promoter) بتحديد التردد Frequency (أو عدد المرات) التي تُنسخ فيها شفرة المورث إلى الـــRNA الرسول، ولا يُغيِّر المحرك سرعة البلمرة خلال النسخ (Transcription) إنما يُغير عدد مرات بدء النسخ. تتميز المحركات القوية بدرجة تآلف عالية مع أنزيم بلمرة الـــRNA (RNA polymerase).

لدى مقارنة المحركات في مورثات مختلفة من بكتيريا E. coli تم تمييز تسلسل إجماعي (Consensus) في المحرك يسمى "صندوق تاتا" (TATA box) وهو التسلسل (5´TATAA3´) الذي تقع نقطته الوسطية في موقع يسبق (Upstream) نقطة بدء النسخ (Initiation site) بحوالى 10 bp، أي المنطقة 10- (10 region-)، هناك تسلسل إجماعي آخر (5´TTGACA3´) يقع في منطقة 35- (35 region-). تبين أن المحرك الأقوى هو المحرك ذو التسلسل الأكثر تماثلاً مع هذين التسلسلين الإجماعيين. ذلك بالإضافة إلى عامل مهم هو المسافة الفاصلة بين المنطقة 10- والمنطقة 35- حيث تبلغ المسافة المُثلى 17 bp. تُشكِّل إمكانية قياس التعبير الجيني أمراً ضرورياً لتحسين أداء البكتيريا في التقانة الحيوية، وقد تم تطوير تقانات عديدة عالية الدقة والحساسية لهذا الغرض.

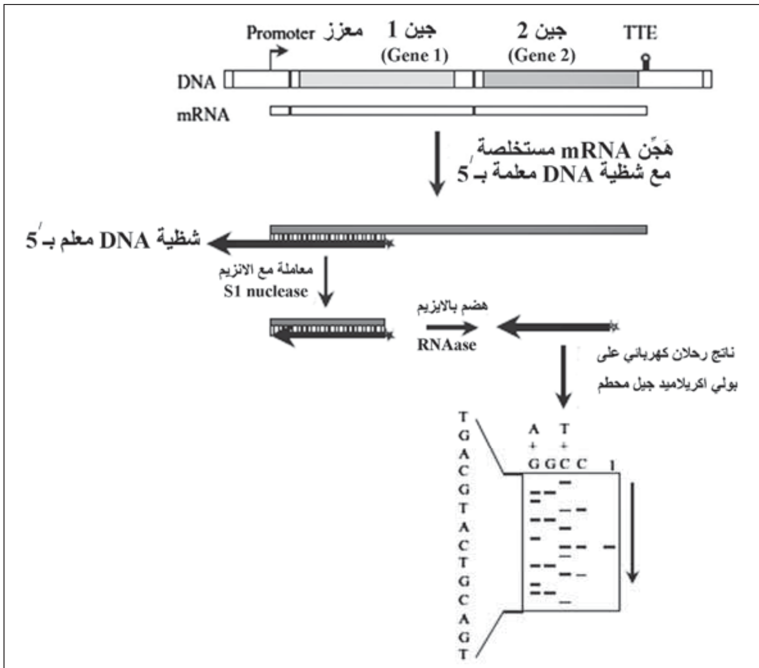
1.7.4 تحليل نسخ الـــRNA الرسول
Analysion of messenger RNA transcripts (mRNA)

هناك ثلاث طرق مخبرية لتحليل نسخ الـــRNA الرسول: "وصمة نورثرن" Northern blotting التي ذكرت سابقاً (مقطع 7.4.4)، وتقانة Nuclease S1 mapping وتطويل بادئ التفاعل Primer extension analysis . في الطريقتين الأخيرتين يمكن تحديد موقع بدء النسخ (Transcription initiation site) بالإضافة إلى كمية الـــRNA النسبية لمورث ما.

تتضمن "وصمة نورثرن" فرز جزيئات الــRNA حسب طولها بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام من أكاروز (Agarose) أو أكريلاميد متعدد (Polyacrylamide) أضيف إليه فورماميد (formamide) أو يوريا (Urea) أو أي مواد ماسخة (Denaturing) كي تمنع تكوين بنية ثانوية (Secondary structures) أي التفاف الجدلة على نفسها، لأن الالتفاف يؤدي إلى فرز غير متناسب مع طول الجزيئات. بعد عملية الفرز هذه يتم الوصم (Blotting) بتحويل سلاسل الــRNA من الهلام إلى غشاء نايلون مُنشَّط (Activated nylon) ثم يتم تثبيتها على الغشاء بروابط تساهمية (Covalent cross-linking). ثم يتم كشف نوع محدد من الــRNA بواسطة التأشيب (Hybridisation) وذلك باستعمال مسبار موسوم من DNA أو RNA (labeled DNA or RNA probes) مكمِّل في تسلسله لنوع معين من الــRNA. لتحديد طول سلاسل الــRNA يُستخدم أثناء العملية مؤشرات الطول الجزيئي (Molecular size markers) التي تتكون من مجموعة جزيئات من الحمض النووي ذات طول معلوم. إن معرفة طول الــRNA يعطي فكرة جيدة عن هيكلية المورث أو وحدة النسخ.

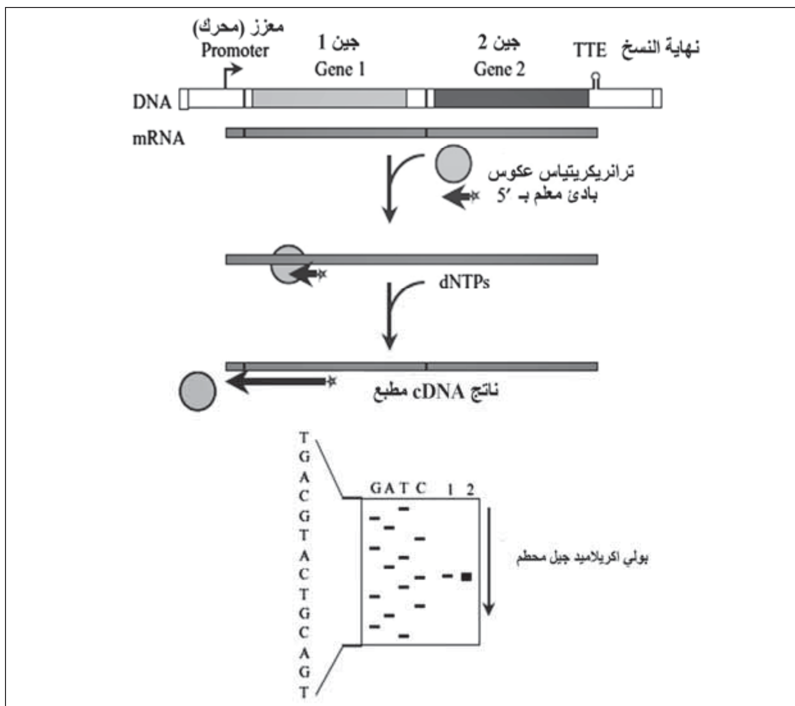
أما تقنيتا Nuclease S1 و تطويل البادئ (Primer extension) فإنهما قادرتان على الكشف عن طرف ’5 لمنسوخات الــRNA الرسول أو المنسوخات الأولية (Primary transcript). في حالة Nuclease S1 mapping (الشكل 20.4) يتم تهجين (Hybridised) الــRNA الرسول مع سلسلة محددة من DNA أحادي الجدلة موسوم على طرف ’5 ويتداخل (Overlapping) مع بداية منسوخ الــRNA المستهدف. بالنتيجة نحصل على جزيء هجين بين الــRNA والــDNA ذي أطراف ´3 أحادية الجدلة، فيتم هضمها بواسطة نيوكليز S1 (Nuclease S1) المختص بقطع الحمض النووي أحادي الجدلة. بعد ذلك تتم معالجة الهجين لإزالة جدلة الــRNA ثم يتم الكشف عن طول الــssDNA المتبقي (الموسوم على طرفه ´5 الثابت) بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام ماسخ (Denaturing) من بوليأكريلاميد، ومقارنة بسلم من سَلسَلة الــDNA كمؤشر للحجم الجزيئي (Molecular weight marker).

أما بالنسبة إلى تقانة تطويل بادئ التفاعل (Primer extension analysis) (الشكل 21.4)، فيتم استعمال بادئ تفاعل (أوليغونيوكليوتيد) موسوم على الطرف ´5 ويلتحم (يتهجن Hybridize) في موقع يتلو نقطة بدء النسخ (المتوقعة) بحوالى 60 إلى 100 bp. ثم يتم تطويل بادئ التفاعل هذا بناء على التسلسل في الــRNA وذلك بواسطة أنزيم النسخ العكسي (Reverse transcriptase). ينتج من ذلك جدلة الــDNA المُكمِّل (Complementary DNA) التي تتوقف على الطرف ’5 من منسوخ الــRNA وهي ذات طول محدد. على غرار ما سبق، يتم الكشف عن طول الــDNA المكمِّل بواسطة الرحلان الكهربائي، مقارنة بسلم من سَلسَلَة الــDNA (باستعمال نفس بادئ التفاعل) كمؤشر للحجم الجزيئي.



الشكل 20.4 : رسم خريطة لنقطة بدء النسخ باستعمال SI nuclease. يُهجَّن الــRNA مع قطعة DNA ممسوخة (denatured) وموسومة على الطرف ´5. يتم اختيار قطعة الــDNA بحيث يكون الطرف ´5 مكملاً (complementary) لتسلسل داخلي في الــRNA المستهدف ، بينما يكون الطرف ’3 ناتئاً وممتداً بعد نقطة بداية الــRNA الرسول المتوقعة. يحتوي الجزيء الهجين RNA/DNA على أطراف أحادية الجدلة يتم هضمها باستعمال أنزيم nuclease S1 المختص

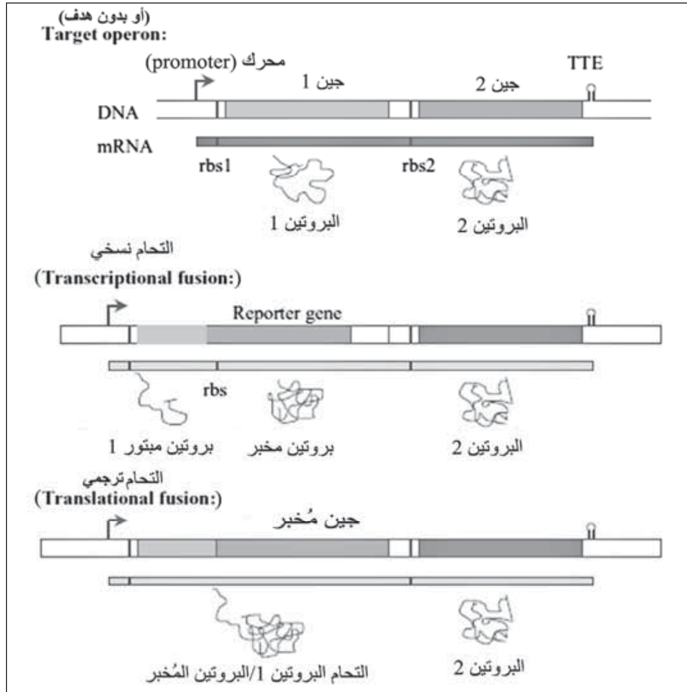
بقطع الحمض النووي أحادي الجدلة. ثم يتم الكشف عن الطرف ´3 للـDNA المكمِّل بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام ماسخ (denaturing) من بولي‌أكريلاميد، ومقارنة بسَلسَلة لنفس الـDNA الأصلي (بطريقة ماكسام وجلبرت التي تعتمد على القطع الكيميائي) .



الشكل 21.4: تحليل إطالة بادئ التفاعل لمنسوخ RNA رسول معين. Primer extension analysis of a specific mRNA transcript. يُستعمل بادئ تفاعل (أوليغونيوكليوتيد) موسوم على الطرف ‘5 ويلتحم (يتهجن hybridize) مع الـRNA المستخلص في موقع يتلو نقطة بدء النسخ (المتوقعة) بحوالى 60 إلى 100 bp. ثم يتم تطويل بادئ التفاعل بواسطة أنزيم النسخ العكسي (reverse transcriptase) وهو أنزيم بلمرة DNA يعتمد على قالب من الـRNA (RNA dependent–DNA polymerase) ويتطلب ذلك إضافة الأنواع الأربعة من نيوكليوتيد (dNTP) كمواد أولية للتفاعل. تتوقف بلمرة جدلة الـDNA المكمِّل (complementary DNA) على الطرف ‘5 من منسوخ الـRNA. ثم يتم تحديد طول الـDNA المكمِّل (cDNA) بواسطة الرحلان الكهربائي (الممر 1 و 2) على هلام يحتوي على سَلسَلة للـDNA (باستعمال نفس بادئ التفاعل) كمؤشر للحجم الجزيئي. تسمح هذه العملية بكشف النيوكليوتيد الأول حيث بدأت عملية النسخ. تعتبر طريقة التحليل هذه شبه كمية (semi–quantitative)، لذلك فإن سماكة الشريط الناتج من كل عملية تطويل لبادئ التفاعل تعكس مباشرة كمية الـRNA الرسول المحدد (الذي التحم معه البادئ). تساعد هذه التقانة على مقارنة فعالية محركين متلاصقين لنفس المورث.

4.7.2 تقنية التحام الجينات Gene fusion technology

تُعد تقنية الجين المُخبِر (Reporter gene) من أهم التقانات المستعملة في تحليل التعبير الجيني. تُستعمل هذه التقانة عندما يكون الجين أو الأوبرون قيد الدراسة يرمز إلى بروتين يصعب قياسه وتحليله. بالتالي فإن التصاق الجين المخبر مع الجين قيد الدراسة يساعد على كشف هوية العوامل الضابطة للتعبير الجيني. مؤخراً تم تطوير تقانة التحام الجينات لتسهيل دراسة التعبير الجيني على مستوى الخلية الواحدة، هذا ما يسمح برؤية وبتمييز الاختلاف بين الخلايا وتحديد مواقع البروتينات في الخلية.



الشكل 22.4: بناء التحام مع جين مخبر. في حالة الالتحام الجيني "النسخي" يتم نسخ الجين المخبر بواسطة محرك الجين المستهدف، ولكن ترجمة الجين المخبر تتم باستخدام موقع ارتباط الرايبوسوم الخاص به. بينما في حالة الالتحام الجيني "الترجمي" تتم ترجمة الجين المخبر بواسطة موقع ارتباط الرايبوسوم للجين المستهدف، لأن الجين المخبر أزيل موقع ارتباط الرايبوسوم الخاص به، وتم التحام في الإطار الصحيح لترجمة الجين المستهدف (جين 1). نتيجة هذا الالتحام الجيني هي عبارة عن بروتين 1 مبتور وملتحم مع البروتين من الجين المخبر. يرمز TTE إلى تسلسل موقع وقف النسخ.

تقتضي تقانة الجين المخبر ثلاثة عناصر أساسية متغيرة: (أ) نمط الالتحام المبني (Type of fusion constructed)، للنسخ أو للترجمة. (ب) نوع الجين المُخبر المستعمل. (ج) طريقة التشخيص (باستعمال أنزيمات، أو أمصال، أو تفاعل كيميائي خلوي (Cytochemical assay)

أنواع الالتحام الجيني — Type of gene fusion

يمكن للالتحام الجيني أن يكون "نسخياً أو ترجمياً (translational أو Transcriptional) (الشكل 22.4). في حالة الالتحام الجيني "النسخي" يتم وضع الجين المخبر في موقع يتلو محرك الجين المستهدف، و يجب أن يحتوي الجين المخبر على موقع ارتباط رايبوسوم (Ribosome binding sites) فعال في خلية البكتيريا المضيفة. في هذا النوع من الالتحام حيث يكون المخبر "نسخياً" (Transcriptional reporter) يمكننا فقط دراسة نشاط وفعالية محرك الجين المستهدف وما يتعلق بذلك من تسلسلات نيوكيوتيدية ضابطة و منظِّمة. كما تتعذر في هذه الحالة دراسة الضبط والتنظيم ما بعد النسخ (Post-transcriptional) للجين المستهدف.

وأما في حالة الالتحام الجيني "الترجمي" (الشكل 22.4)، يتم التحام الجين المخبر مع الجين المستهدف في نفس إطار القراءة (Reading frame) لشفرة الترجمة. بعد النسخ والترجمة، ينتج بروتين هجين من بروتين المستهدف مع بروتين المخبر. حيث يكون الطرف N (N Terminus) هو جزء من البروتين المستهدف والطرف الثاني C (C Terminus) هو البروتين المخبر بكليته. يختلف طول الجزء من البروتين المستهدف بحسب نوع التحليل. فإذا كان الهدف هو فهم ميكانيكية ضبط تنظيم عملية التصنيع، فإن الجزء من البروتين المستهدف قد يكون قصيراً جداً، حوالى عشرة أحماض أمينية. بينما إذا كان الهدف هو تحديد موقع البروتين المستهدف في الخلية فقد يكون من الضروري دمج البروتين كاملاً مع البروتين المخبر.

الجينات المُخبِرة Reporter genes

لقد تم تطوير نواع عديدة من الجينات المخبرة من أجل استعمالها في تطبيقات معينة، تُناسب معظم تلك الجينات الاستعمال في أنواع بكتيرية عديدة. من بين الجينات المخبرة هناك المخبرات الملونة (Chromogenic reporters) مثل lacZ في .E coli الذي يعطي أنزيم β كلتاكتوسديز (β-galactosidase) والذي يمكن تشخيصه وكشفه عن طريق تغيير اللون. هناك أيضاً جينات مخبرة تُستعمل في اختبارات كشف أنزيمية أو مناعية (Enzyme assay or immunodetection)، و تلك المقاوِمة للمضادات الحيوية مثل cat (Chloramphenicol acetyl transferase) المقاوم للمضاد الحيوي كلورامفينيكول الذي يتم تشخيصه عن طريق تفاعلات أنزيمية وتقانة انتقائية. نذكر أيضاً الجين المخبر المشع والمضيء (Fluorescent and luminescent)، على سبيل المثال نذكر luxAB الذي يُشفِّر أنزيم تحليل لوسيفرين أو لوسيفيرايز (Luciferase) الذي يُسرِّع تفاعلاً أنزيمياً منتجاً للضوء، و gfp الذي يُشفِّر بروتيناً أخضر مشعاً (Green fluorescent protein). ويتم الكشف عن تلك الجينات المخبرة باستعمال القياس الطيفي – سبكترومتري (Spectrometry)، أوالقياس الضوئي – لومينومتري (Luminometry) أو تصوير الفيديو المجهري (Video/ Photomicroscopy).

نمط التعبير الجيني لكامل الجينوم Genome-wide expression profiling

يُعبِّر المصطلح ترانسكوبتوم (Transcriptome) عن الـــRNA الناتج من كل الجينات المنسوخة داخل البكتيريا في وقت ما. لقد شاع استعمال تقانة مصفوفات الـــDNA (مقطع 8.4.4 DNA arrays) لمتابعه التغيرات الحاصلة بالتعبير الجيني لكامل الجينوم، وذلك في تجربة مخبرية واحدة. يمكن أن تستخدم هذه التقانة مثلاً لمقارنة التغيرات الحاصلة بالتعبير الجيني نتيجة ضغط معين كوجود مواد مؤكسِدة (Oxidalive stress) أو نقص في مادة غذائية (Nutrient deprivation). كما تُستخدم هذه التقانة لمراقبة التعبير الجيني بعد حدوث طفرة معينة، أو أثناء الالتهام من قبل خلايا Macrophage أو خلال عمليات التخمير.

8.4 هندسة الجينات، والحصول على إنتاج أمثل

Engineering genes and Optimizing products

هناك الكثير من التقانات الحيوية التجارية المهمة التي تستعمل كائنات حية مجهرية من الطبيعة. كمثال نذكر هنا تقانات تصنيع الحليب ومشتقاته كاللبن الذي تُنتِجُه بكتيريا اللبن لاكتوكوكس كازيي (Lactococcus casei)، أو تصنيع مذيب عضوي (تصنيع أسيتون بواسطة كلوستريديوم أسيتوبوتيليكوم (*Clostridium acetobutylicum*)، وكذلك إنتاج أنزيمات للاستعمال المنزلي والصناعي، مثل α أميليز α-amylases، ومحللات البروتين Proteases، وإنتاج البنسلين أسيليز (*Penicillin acylases*) من أصناف العصييات (*Bacillus*). كل تلك العمليات تتميز من تلك الموجودة في الطبيعة وقد تقتضي متتطلبات خاصة على المُصنِّع، أكان كائناً مجهرياً أو أنزيماً صناعياً غير موجود في البيئة الطبيعية. لذلك يقتضي أن تتم هندسة الأنزيم أو الكائن المجهري كآلية لتوفير الظروف المثلى للإنتاج.

1.8.4 : هندسة البروتين ومساراته Protein and pathway Engineering

من أفضل الأمثلة وأكثرها دراسة في إطار تحسين أداء الأنزيم للأفضل، هو أنزيم محلّل بروتيني قاعدي (*Alkaline protease*) يسمى سبتليزن (*Subtilisin*) تم استخلاصه من بكتيريا الـــBacillus Subtilis والسلالات القريبة منها (B. *licheniformis, B. stearothermophilus*) يستعمل هذا الأنزيم كمزيل للبقع في صناعة المنظفات، إذ إنه يستخدم في 95% من تركيبات مساحيق الغسيل ما يساعد على إزالة البقع البروتينية بطريقة فعالة وعلى حرارة أدنى من تلك التي تستعمل عادة في تنظيف الملابس. إن المتطلبات المثالية لهذا الأنزيم هي الثبات على درجة حرارة تصل إلى 70ºC وعلى حموضة (pH) تتراوح بين 8 و 11، ومقاومة مواد التنظيف غير الأيونية (Non-ionic detergent)، وكذلك مقاومة العوامل المؤكسِدة مثل بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide)، وعدم الحاجة لشوارد معدنية كي تعمل. بناءً على المعلومات المستفيضة لنشـــاط التسريع (Catalytic activity) لأنزيم سبتليزن

وبنيتها وهيكلها الثلاثي الأبعاد، فقد تمت هندسة الأنزيم بالطفرة الموجهة لموقع (Site-directed mutagenesis) (مقطع 10.4.4) كي يصبح الأنزيم المعدل أفضل لجهة الخصائص الثلاث مجتمعة.

وفي مقاربة بديلة، تم تحسين خصائص الأنزيم α–أميليز من بكتيريا العصيبات (*Bacillus*). في هذه الحالة اعتُمِد التأشيب الطبيعي (Natural recombination) لإنتاج أميليز هجين وفعال، وذلك انطلاقاً من مورثات أميليز متقاربة ومختلفة في بكتيريا *B. amyloliquefaciens*، و *B. licheniformis* و *B. stearothermophilus*. بعد انتساخ جينات تلك الأنزيمات بشكل ازدواجي يضم مورثين مختلفين للأميليز (الزوج يضم كل الاحتمالات بين أنواع الأنزيم)، يُصار إلى تنفيذ عدة دورات من التأشيب التبادلي (Reciprocal recombination) الذي يُنتِج عدداً كبيراً من الخلايا التي تحمل مورثات أميليز هجينة مُختلفة. ولأجل اختيار الخلايا المطلوبة نقوم عندها بمسح لصفات الأنزيم في مختلف الخلايا واختيار الأنسب. بعد تراكم المعلومات حول البنية الهيكلية ثلاثية الأبعاد والعلاقة بين الهيكل الأنزيمي والخصائص الوظيفية كالثبات الحراري (Thermostability)، أصبح من الممكن مقاربة موضوع تحسين الأنزيم بشكل مباشر أكثر. باستعمال تقانة الـــPCR وبالتحديد في جدل الجين (PCR gene Splicing) تم وصل قطع من جينات أنزيم الأميليز المختلفة لتكوين هجائن محددة من أنزيم α–أمليز.

أظهرت الدراسات المقارنة لتسلسل الـــDNA والبروتين أهمية التأشيب بقطع كبيرة بالنسبة إلى تغيير البروتين الهيكلي، في حين أن الطفرات النقطية (Point mutation) تبقى محدودة التأثير في الهيكل. لقد أثمرت تلك الدراسات تطوير تقانات جزيئية منها خلط الـــDNA (DNA shuffling) أو الـــPCR الجنسي (Sexual PCR)، وذلك لتسهيل عملية تطوير البروتين. يعتمد مبدأ هذه التقانة على خلط عشوائي بين قطع من DNA من الجين المستهدف، ثم استعمال الـــPCR (مقطع 4.4.4) لجمع وتصفيف القطع في جين متسلسل كامل، حيث تُستعمل قطع الـــDNA ذاتها (الممزوجة) كبادئ تفاعل. يُستعمل ناتج الـــPCR بعد ذلك لتحضير مكتبه جينية (مقطع 5.4.4) تحتوي على جينات هجينة خيالية

(Chimaeric) (نتج من دمج قطع DNA لجينات مختلفة)، ثم يُصار إلى اختيار النسيلة (Clone) الحاملة للأنزيم ذي الصفات المحسنة المنشودة. ومثال على استعمال هذه المنظومة نذكر عملية تحسين أنزيم β-كلتاكتوزيديز (-β galactosidase) من بكتيريا الـــ *E. coli* بحيث ازداد نشاطه النوعي 60 مرة، وذلك مع نوع من السكر لم يكن يستعمله كمادة أولية (Substrate) من قبل. كما تم إنتاج نوع من البروتين الأخضر المضيء أو الفليورسي (Green fluorescent protein مقطع 2.7.4) ذي إشارة ضوئية أكثر بـــ45 مرة.

تنتج البكتيريا مركبات مهمة ومختلفة ذات أهمية اقتصادية وتجارية إذا ما أُنتِجت بتركيز مناسب. في العادة، عند توفر بكتيريا مُنتِجة لكمية معقولة من مركب ذي أهمية تجارية، يمكن عندئذٍ توجيه البكتيريا لإنتاج ذلك المركب بكمية أكبر. يمكننا التوصل إلى ذلك عن طريق طفرات عشوائية في مجموعات أو عشائر (Population) من هذه الكائنات الحية ثم انتقاء الطفرة المسبِّبة لإنتاج تركيز أعلى من المادة المطلوبة. كما يمكن انتساخ جين اصطناعي (Synthetic gene) ثم لصقه مع محرك نسخ خارق الفعالية و إشارات ترجمة عالية الأداء. في حين أن هناك أمثلة تُثبِت نجاح هذ الطريقة (مثلاً إنتاج مضادات حيوية وأحماض أمينية)، إلا أن الفترات الأخيرة شهدت استخدام منحى أكثر عقلانية من خلال هندسة مسار تفاعلات الأيض كاملاً، إما من أجل زيادة إنتاج المادة المطلوبة أو تحويل مسار التفاعل باتجاه إنتاج مادة محددة.

9.4 إنتاج مواد مختلفة الأصل (غريبة)

Production of heterologous products

من أهم التطبيقات التقليدية للتقانات الوراثية في مجال الصناعة، هناك زيادة إنتاج مواد طبيعية مختلفة كالأنزيمات، والمضادات الحيوية والفيتامينات (انظر مثلاً الفصول: الرابع عشر، الخامس عشر، الثامن عشر، العشرين والحادي والعشرين). أما بالنسبة إلى البروتينات بشكل عام، فهناك أنواع محدودة فقط متوفرة بشكل تجاري، وتنتج تلك البروتينات باستخدام تقانات متوفرة أصلاً في

المضيف الطبيعي، مثال على ذلك محللات البروتين (Proteases) من العصيات (*Bacillus sp*). يمكن الآن عزل أي جين من أي مادة حيوية وانتساخه في بكتيريا أو أي نظام مضيف آخر. علماً بأن الانتساخ بذاته لا يضمن حصول التعبير الجيني المطلوب، وفي حال حصول التعبير فإنه لا يضمن فعالية ونشاط البروتين. إذ إن هناك عوامل عديدة لا بد من أخذها بعين الاعتبار لضمان منتج فعال ذي قيمه تجارية مستمرة. على سبيل المثال فإن اختيار الخلية المضيفة والناقل يحدد استراتيجية انتساخ وتعبير ذلك الجين، ويؤثر ذلك مباشرة في الإنتاج الكمي وفي مدى مطابقة المنتَج مع ما هو منشود. أحياناً لا يمكن استعمال منظومة البكتيريا لإنتاج مواد حيوية فعالة أو مواد مقبولة لأغراض صيدلانية. هنا لا بد من استعمال نظام مضيف وناقل يعتمد على خلايا من كائنات راقية، كزراعة خلايا كائنات ثديية أو خلايا من الحشرات.

1.9.4 أنظمة المضيف وفوائدها النسبية

Host systems and their relative advantages

في فترة ما قبل السبعينيات، كانت الطريقة الوحيدة للحصول على بروتين أو بوليببتيد لأغراض تحليلية أو علاجية، هي العزل والاستخلاص من المصادر الطبيعية، وفي حالات قليلة جداً (مثلاً بيبتيد ناشط حيويًا Bioactive peptide) يمكن الاعتماد على التصنيع الكيميائي. ثم فتحت تقانة الــDNA المؤشب الأبواب لعزل وانتساخ الجين المسؤول عن منتَج ما وإنتاجه بكمية غير محدودة في كائن مجهري مثل E. coli. في البداية كانت الجينات الوحيدة (من الكائنات ذوات النواة الحقيقية Eukaryote) المنتسخة هي تلك التي تُنتِج كمياتٍ كبيرة من مواد معروفة وسهلة القياس، مثلاً الأنسولين وهرمون النمو البشري (Growth hormone) وأنترفيرون (Interferon). والسبب في ذلك يعود إلى ضرورة توفر معلومات مستفيضة عن تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين، في حين كانت تقانة سَلسَلة البروتينات (Protein sequencing) في ذلك الوقت تتطلب كميات كبيرة من البروتين النقي. أما حالياً، فإن التحسينات التقانة تسمح بانتساخ أي بروتين (معروفة خصائصه) مباشرة

عبر تصنيع نسخة DNA من الــRNA الرسول المستخرج من مصادره الطبيعية، أو بطريقة غير مباشرة عن طريق تصنيع الجين نفسه (Gene synthesis).

بالرغم من أن تقانة التأشيب (Recombinant technology) تم تطويرها ضمن منظومة الخلية البكتيرية، إلا أن هناك ازدياداً في تطبيقها على منظومات الخلايا ذات النواة الحقيقية، وذلك باستعمال تقانات جديدة (انظر الفصل الخامس). ولكن من الناحية الاقتصادية تبقى البكتيريا هي الخيار الأمثل لسهولة تحويرها الوراثي وسهولة وسرعة نموها على مواد غذائية بسيطة.

يُتوقع من البروتينات الناتجة من تقانة التأشيب أن تكون على مستوى الضوابط والمعايير التي تنطبق على الإنتاج التقليدي للعقاقير، خاصة لجهة الفعالية (Potency)، والنقاء (Purity)، والهوية (Identity). باستخدام تقانات تحليلية حساسة يمكن الكشف عن خصائص وميزات المُنتَج، ذلك مع إعارة انتباه خاص لأي آثار جانبية ونشاط حيوي غير مرغوب فيه كإثارة التفاعلات الحساسية أو المناعية. تم إقرار هذه المعايير من قبل سلطات وهيئات تنظيم مختلفة (مثل إدارة الغذاء والدواء في الولايات المتحدة US Food and Drug Administration (FDA)) من أجل الحصول على منتوج صيدلاني مطابق للأصل بدون أضرار صحية عند الاستعمال، هذا ما دفع ببعض المنتجين بالتحول من استعمال البكتيريا الى استعمال الخلايا حقيقية النواة خلال إنتاج المواد. وقد ارتفع مستوى المعايير والمتطلبات نظراً إلى الدقة العالية لاختبارات وتقانات الرقابة التي تكشف عن اختلافات دقيقة بين بروتين طبيعي وآخر محوَّر، كاختبار الكروموتوغرافيا السائلة العالية الأداء (High-performance liquid chromatography HPLC) وقياس الكتلة الطيفي أو (Mass spectrometry) والــNMR أو الرنين المغناطيسي النووي (Nuclear magnetic resonance)، أو امتصاص الضوء المستقطب الدوراني (Circular dichroism).

في كثير من الحالات تذهب جهود الكلونة هباءاً مع اكتشاف تدني مستوى الإنتاج بالنسبة إلى ما خُطط له. ويبقى السبب لهذا الفشل غير معروف ويصعب تحديده. فيما يلي نعرض بعض أسباب الفشل في إنتاج البروتين المأشوب.

2.9.4 النسخ Transcription

إن استنسال أو كلونة (Cloning) قطعة DNA معينة ترمز لبروتين مستهدف لا تُعدُّ كافية لضمان نجاح عملية التعبير. من أجل ضمان عملية التعبير، لا بد – خلال استراتيجية الانتساخ – من إضافة تسلسلات محددة تضمن بدء التعبير في أوقات محددة وبمستوى إنتاج عال في الخلية البكتيرية. يتم تسهيل النسخ من خلال لصق الجين المستهدف في موقع يتلو تسلسل محرك قوي (Strong promoter sequence) مع تسلسل إشارة بدء الترجمة أي (Translation signal). إن قوة المحرك هي من العوامل الأساسية المؤثرة في مستوى تعبير الجين، وتوجد حالياً أنواع مختلفة من المحركات منها ما هو ذي عمل مُنظَّم بإحكام (Tightly controlled)، ومنها ما هو ذي نشاط دؤوب مستمر (Constitutive). يوجد في الـــ E.coli محركات قوية لها قدرة إنتاج عالية لبروتين معين تصل إلى 50% من كامل بروتينات الخلية.

يوجد في الطبيعة عدد من محركات استُعملت للحصول على مستوى تعبير عال جداً للجين المأشوب. ولكن مع ازدياد المعرفة بالعوامل التي تجعل محركاً ما قوياً، أصبح بالإمكان تركيب محركات اصطناعية مهجنة أو مأشوبة بالكامل. إن المحركات التي يتم تحفيزها على العمل باستخدام مواد ثمينة ذات سمية محتملة لا تعتبر مناسبة لعمليات التخمير على نطاق واسع، لذلك صُمِّمت محركات يمكن تحفيزها برفع درجات الحرارة قليلاً أو بانخفاض ضغط الأكسجين أو حتى بإضافة سكريات رخيصة ومتوفرة.

تؤدي عملية التعبير الجيني باستعمال محركات قوية إلى ضغط وحمل كبير على عمليات الأيض في الخلية، لذلك لا بد من ضبط عملية النسخ والسيطرة عليها بشكل دقيق. ومن العوامل المهمة لضبط النسخ إضافة إشارة تسلسل (Transcription termination element أو TTE) يُنهي النسخ في موقع محدد. في حال عدم إضافة هذا التسلسل فسيؤدي ذلك إلى تدنٍ كبير في عمليات إنتاج البروتين المطلوب، وذلك لأن جهود الخلية وطاقتها تُبدد بإنتاج مستوى عالٍ من RNA رسول غير مُنتج (بسبب عدم توقف النسخ على نهاية الجين المستهدف).

وتظهر ضرورة ذلك أكثر عندما يكون الجين المستهدف محمولاً على بلازميد متعدد النُسخ (Multicopy)، في هذه الحالة يتدنى ثبات البلازميد في الخلية نتيجة نشاط نسخ مرتفع جداً وغير مفيد لعملية مضاعفة البلازميد وفصله عند انقسام الخلايا، لذلك لا بد من إضافة TTE.

3.9.4 الترجمة Translation

بهدف ترجمة الـــRNA الرسول بشكل فعال لا بد من إضافة تسلسل لموقع ارتباط الرايبوسوم (Ribosome binding site أو RBS) على الـــRNA الرسول في موقع يسبق شفرة بدء الترجمة (Translation start codon) بحوالى خمس نيوكليوتيدات. تختلف الـــrbs من بكتيريا إلى أخرى وذلك حسب اختلاف تسلسل طرف 3’OH للـــRNA الرايبوسومي 16s الذي يتعامل مع الـــRNA الرسول.

تتميز الشفرة الوراثية (Genetic code) بأنها متكررة (Degenerate) وأن الحمض الأميني الواحد يُرمز له بأكثر من كودون أو شفرة (Codon) واحد (كردون أو شفرة = ثلاثة قواعد نيوكليوتيدية). تعتبر الشفرات المختلفة للحمض الأميني الواحد "مرادفات"، ولكنها لا تتواجد بالضرورة بنفس التردد. ففي معظم أنواع البكتيريا يتم تفضيل استخدام شفرة معينة (بدون المرادفات الآخرى) خاصة في المورثات ذات التعبير العالي. وإن الاختلاف في تردد استخدام الشفرات المرادفة يعكس نسبة الـــGC في DNA الكائن الحي، وتكون الشفرات المُفضلة هي المكملة لـــRNA ناقل (tRNA) محدد ذي أعلى نسبة في الخلية. وبما أن معظم الشفرات (Codons) يتم تميزها بواسطة جزيء الـــRNA الناقل (tRNA) الذي يحمل الحمض الأميني (Aminoacyl-tRNA) أو أمينواسيل-RNA الناقل، فإن استخدام شفرة غير مفضلة ينتج منه انخفاض منسوب الترجمة وارتفاع نسبة الخطأ في الترجمة (أي وضع حمض أميني غير مناسب)، فوق النسبة العادية التي تُقدر بخطأ واحد كل حوالى 3000 حمض أميني. يمكن حساب درجة الانحياز (Codon bias) أو التفضيل في استخدام الشفرة والذي يمثل الميل إلى استخدام شفرة ما عن مرادفاتها، وذلك من خلال حساب نسبة استعمال شفرة ما ومرادفاتها (Relative synonymous codon usage أو RSCU) بواسطة المعادلة التالية:

$$RSCU = \frac{\text{عدد مرات استعمال شفرة معينة}}{\text{العدد المتوقع لمرات استعمال الشفرة لو لم يكن هناك تفضيل}}$$

إذا كانت $RSCU = 1$ فيعني ذلك أن الشفرة تُستخدم بدون انحياز. أما إذا كان $RSCU < 1$ (أقل من واحد) فيعني أنها شفرة غير مفضلة، وإذا كان $RSCU > 1$ (أكبر من واحد) فيعني أنها شفرة مفضَّلة.

إن تقانة تركيب الجينات اصطناعياً تسمح للجين بأن يُصنع باستخدام الشفرة الأمثل بالنسبة إلى السلالة المضيفة والمنتِجة. تظهر أهمية اختيار الشفرة من خلال مثال على إنتاج مادة إنترلوكين–2 (Interleukin 2 أو IL2) بواسطة بكتيريا الـــ E. coli. فعندما تم تحليل مورث الـــIL-2 الأصلي (399 bp) بالنسبة إلى الشفرات المستعملة، تبين أن هناك فقط 43% من شفراته مفضلة من قبل الـــE. coli. لذلك رُكِّبت النسخة الاصطناعية من هذا الجين باستعمال شفرات مُرادفة ومُفضلة من قبل البكتيريا بنسبة 85% من الشفرات. وعندما تمّت دراسة التعبير للجين الأصلي وذاك الاصطناعي في الـــE. coli وباستعمال نفس الناقل، تبين أن كمية الـــRNA الرسول للـــIL2 متشابهة في الحالتين (الجين الطبيعي والإصطناعي)، بينما كان مستوى إنتاج البروتين الناشط حيوياً أكثر في حالة الجين الاصطناعي بتسع مرات من النسخة الأصلية الطبيعية.

4.9.4 تكوين أجسام حويصلية Formation of inclusion bodies

لدى إنتاج أنواع كثيرة من البروتينات المأشوبة، وخاصة عند إنتاج تركيز عالٍ في الخلية، فإن البروتينات تعجز عن الانطواء (Folding) بشكل طبيعي، وتبدأ بالتجمع مع بعضها البعض مكونة خثرةً أو تكتلاً كبيراً يُعرف بالجسم الحويصلي. تظهر هذه الأجسام خاصة في البكتريا المُنتِجة لبروتين من كائن ثديي (Mammalian protein). يتراوح شكل البروتين الموجود في الأجسام الحويصلية بين هيكل مشابه للبروتين الأصلي الطبيعي (Native state) وهيكل ذي التفاف خاطئ كلياً لا يمكن تفكيكه وفك ارتباطه بالحويصلة إلا في ظروف مسخ (Denaturation) قصوى. إن حجم وحالة، وكذلك كثافة الجسم الحويصلي

تتغير حسب طبيعة البروتين المأشوب ومميزاته، وبحسب العوامل المؤثرة في فسلجة الخلية ونموها (مثال سرعة النمو، درجات الحرارة، الوسط الغذائي ... إلخ). يمكن أحياناً منع أو خفض تكوين الجسم الحويصلي بتغير ظروف التخمير.

قد يؤدي تكوين الأجسام الحويصلية إلى (أ) إنتاج بروتين غير ناشط حيوياً (ب) إنتاج محصول أقل من المستوى المثالي (Suboptimal) (ج) صعوبة في عزل وتنقيه البروتين. ولكن تكوين الأجسام الحويصلية قد يكون إيجابياً في بعض الأحيان، إذ إن الجسم الحويصلي هو بروتين عالي النقاوة وغير قابل للذوبان خلال ظروف استخلاص لطيفة (Mild extraction condition). لذلك يمكن تصميم تقانة غير حادة لاستخلاص الأجسام الحويصلية في حالتها غير الذائبة، ثم يعاد التفاف البروتين في الظروف المناسبة وبالشكل الطبيعي ليصبح بروتيناً فعالاً. يمكن أحياناً تجاوز مشكلة تكوين الأجسام الحويصلية باستخدام أنظمة الملتهم إفرازية (القسم 4.5.4) حيث يتم إفراز البروتين المطلوب إلى محيط الغشاء البلازمي (Periplasm) أو إلى الوسط الغذائي.

10.4 تحليل الجينوم البكتيري بواسطة البرامج المعلوماتية أو "إنسيليكو" In silico analysis of bacterial genomes

إن توفُّر سلسلة الجينوم لعدد لا بأس به من الكائنات المجهرية قد فتح الطريق أمام مقاربة جديدة لدراسة وتحليل البكتيريا، كما وأن الانتشار والتطور الواسع للمعلوماتية الحيوية (Bioinformatics) أضحى قادراً على الكشف عن مفاهيم ومعلومات مهمة عن تطور البكتيريا ووظيفة المورثات فيها. فأصبح بالإمكان الإجابة عن أسئلة طالما كانت معلقة، وخاصة فيما يتعلق بآلية ومراحل التطور (Evolutionary mechanisms) والعلاقة بين انتظام الجين (Gene order) ووظائفه.

من أهم التطورات في طرق دراسة وتحليل الكائنات المجهرية نذكر توفُّر الحاسوب الشخصي بقدرة عالية (Personal computer)، وشبكة الإنترنت وتطورها، وتقانة المعالجة المتوازية والشبكية (Grid and parallel processing)، أمَّن كل ذلك للباحثين كمّاً هائلاً من أدوات المعلوماتية الحيوية الفعالة والقوية. إن

اجتماع المعلوماتية الحيوية مع طرق الدراسة في الحي (*in vivo*) وفي الزجاج (in vitro) أدى إلى ولادة علم الأحياء للأنظمة (Systems biology) الذي يسعى إلى تحليل واستيعاب (Integrate) المعلومات الهائلة الناتجة من مصادر مختلفة، عن التقانات ذات الدفق العالي (High Throughput technologies). أمّا الهدف النهائي لهذا فهو التوصل إلى نموذج (Model) يبين تصرف الكائن الحي بكليته، بما فيها جوانب من تطوره. بالرغم من أن هذه التقانات لا تحل محل التجارب المخبرية في الأنابيب، إلا أن هذه النماذج بيّنت عن قدرات مهمة خاصة في تصويب وتوجيه المسار التجريبي والمقاربة التقليدية.

هناك بضعة أنواع من برامج الحاسوب المخصصة لتحليل تسلسلات جينوم البكتيريا. من ضمنها نذكر تلك التي تحاول الكشف عن المورثات التي تُشفِّر البروتينات، أو عن إشارات في التسلسل كموقع ارتباط الرايبوسوم، أو عن محركات (Promoter) ومواضع التصاق البروتين على الحمض النووي، ومنها ما يساعد على مقارنة تسلسل DNA محدد بالتسلسل من مصادر أخرى مهما كانت. إن البرامج التي تكشف عن المورثات التي تحمل شفرة البروتينات (Protein-encoding genes) تقوم بترجمة التسلسل الجيني نظرياً، وذلك في ستة أطر للقراءة (Reading frame) (أي ثلاثة أطر قراءة لكل جدلة من الـــ DNA)، ثم يقوم البرنامج بتحليل المعلومات الناتجة للبحث عن سلسلة طويلة من الأحماض الأمينية غير منقطعة بإشارة توقف تفاعل (Termination codon). تسمى هذه السلسلة الطويلة إطار قراءة مفتوح (ORF أو Open reading frame) ، يتراوح طول إطار القراءة المفتوح من بضع عشرات إلى بضعة آلاف من الأحماض الأمينية. أما البرامج الأكثر تطوراً في كشف المورثات الحاملة لشفرة بروتين، فإنها تبحث – إضافة إلى إطار القراءة المفتوح – عن مواقع ارتباط الرايبوسوم السابقة مباشرة لشفرة بدء الترجمة المفترضة. كما يمكن لهذا البرنامج أن يُشَخِّص احتمالات الخطأ خلال السَلسَلة وما ينتج منها من انزياح في إطار القراءة (Frame shift).

وعندما يتم تشخيص بروتين مفترض (Putative proteins) بواسطة الحاسوب، يتولى برنامج آخر المقارنة ببروتينات أخرى حقيقية أو فرضية، وذلك

بهدف إيجاد ارتباط أو تشابه ما. لا بد لهذا من أن تتوفر مكتبات تحتوي على مستودع للتسلسلات التي تم كشفها في الـــDNA و البروتين، وهي القواعد البيانية (Databases) التي يمكن استعمالها عبر شبكة الإنترنت من خلال برامج FASTA وBLAST . تعطي تلك البرامج قوائم تسلسلات البروتين أوالـــDNA ونتيجة مقارنتها بالتسلسل قيد الدراسة ودرجة التشابه (Homology) مع كامل التسلسل أو جزء منه. الإنترنت هي أيضاً مصدر أدوات ووسائل حيويه جزيئية التي تُسهل عدداً من طرق التحاليل منها الكشف عن مجالات بروتينية داخل الغشاء (Transmembrane domains) وعن البُنى الثانوية (Secondary structures) وكذلك إشارات بيبتيدية (signal peptide) في بروتينات مفرزة. أخيراً، هناك استعمال الرسم البياني لوضع نموذج (Model) لشبكات الضبط والانتظام في الخلية، وارتباطات البروتين مع البروتين، ولشبكة المسارات الأيضية.

10.4 مراجع للتوسُّع Further reading

Davies, J. E. and A. L Demain. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999.

Glazer, A. N. and H. Nikaido. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.* New York: W. H. Freeman and Company, 1995.

Lewin, B. *Genes VIII*. Oxford: Oxford University Press, 2004.

Primrose, S. B., R. M. Twyman and R. W. Old. *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering.* 6th ed. Oxford: Blackwell, 2001.

Snyder, L. and W. Champness. *Molecular Genetics of Bacteria* . Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997.

Streips, U. N. and R. E. Yasbin. *Modern Microbial Genetics*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 2002.

Wren, B. and N. Dorrell. *Functional Microbial Genomics.* London: Academic Press, 2002.

Zhou, J., D. K. Thompson. Y. Xu, and J. M Tiedje. *Microbial Functional Genomics.* New York: Wiley-Liss, 2004.

الفصل الخامس

الهندسة الوراثية للخمائر والفطريات الخيطية

Genetic Engineering: Yeasts and Filamentous Fungi

David B. Archer — **دافيد بي. ارتشر**

Unversity of Nottingham, UK — **جامعة نوتنغهام، المملكة المتحدة**

Donald A. Mackenzie — **دونالد مكنزي**

Institute of Food Research, UK — **معهد الأبحاث الغذائية، المملكة المتحدة**

David J. Jeenes — **دافيد جي. جونس**

Institute of Food Research, UK — **معهد الأبحاث الغذائية، المملكة المتحدة**

تعريف مصطلحات — Glossary

طفرة ذاتية التغذية — **Auxotrophic mutation**

طفرة في جين تؤدي إلى فقدان قدرة الكائن على تصنيع عنصر غذائي، وبالتالي لزوم توفره في الوسط الغذائي. إن الجين المُكمِّل لهذه الطفرة هو الجين الذي يعيد الكائن الحي إلى الوضع الطبيعي (حيث لا يقتضي إضافة العنصر الغذائي في الوسط لقدرته على تصنيعه بنفسه).

DNA مُكمِّل (متمم) cDNA — **Complementary DNA**

DNA ذو جدلة واحدة وبتسلسل مكمِّل للـــRNA الرسول ويصنع في الزجاج (In vitro). تصنع الجدلة الثانية ليصبح cDNA ذا جدلتين. تحتوي

مكتبات الــcDNA على DNA ثنائي الجدلة (أي dsDNA) محمول في ناقل. المكتبة هي مجموعة النواقل والــcDNA المختلف المحمول فيها.**البروتين المرافق (Chaperone)** : بروتين يساعد في التفاف (Folding) بروتين آخر.

كروماتين (Chromatin) : مجموعة بروتينات وDNA معقدة وفائقة الترتيب والانتظام.

كروموسوم (Chromosome) : وحدة منفردة من الــDNA (حاملة جينات متعددة) والبروتين. وكل صنف من الكائنات الحية يحتوي على عدد محدد من الكروموسومات يختلف عن غيرها (الجدول 5.1)

جزيء DNA دائري (حلَقي) (Circular DNA molecule): انظر تعريف بلازميد.

التكملة أو التتام (Complementation) : قدرة جين على تحويل كائن من حالة طافرة إلى الحالة الطبيعية (Wild-type)، أي يُكمله أو يُتمِّم نقصه.

كوزميد (Cosmid): بلازميد يحتوي ضمن تسلسله على موقع cos من فايج λ الذي يسمح بتغليف (Packaging) كامل للبلازميد ضمن غلاف الفايج البروتيني.

التقاطع أو العبور (Cross-over) : انظر التأشيب المتناظر أو المتماثل (Homologous recombination).

ازدواجية الشكل (Dimorphism) : القدرة على التواجد ببنيتين أو هيكلين متميزين.

الشبكة الأندوبلازمية (ER) (Endoplasmic reticulum): أغشية داخل الخلية الحقيقية النوى وتمثل أوائل مسارات تحضير البروتينات المفرزة.

خرجون، إكسون (Exons): أجزاء من الجين (ما عدا المحرك والدخلون Introns) تحمل شفرات يمكن ترجمتها.

إشارة السلاسل المُعبَّرة (EST) (Expressed Sequence Tag) : جزء أو قطعة من تسلسل الـــcDNA ذات طولٍ كافٍ، يُمَكِّننا من الكشف والتعرف على الجين المنسوخ كاملاً أو على انتساخه.

استنسال أو كلونة التعبير (Expression cloning) : اصطلاح يصف عملية تركيب البروتين ابتداءً من شفرة الجين خلال عملية الإنتساخ.

كاسيت التعبير (Expression cassette) : منظومة من الـــDNA تسمح بنسخ الجين وترجمته إلى بروتين، ويتضمن المحرك (Promoter) وإطار قراءة مفتوح (بدون شفرة توقف Open reading frame) وإشارة إنهاء النسخ (Transcriptional terminator).

جين أو مورث (Gene) : منطقة من الـــDNA يمكن أن تُنسخ إلى RNA.

جينوم (Genome) : كل الـــDNA لدى كائن حي.

نمط جيني أو وراثي (Genotype/ Genotypic) : كل المعلومات التي يحتويها الـــDNA في كائن حي.

مختلف الأصل أو غريب (Heterologous) : جين أو بروتين مختلف الأصل أو غريب في علاقته عن المنظومة قيد الدراسة.

التأشيب المتجانس او المتناظر (Homologous recombination) : قطع تسلسل جدلتين DNA متماثلتين (لجهة التسلسل) ثم التحامهما. يسمى التأشيب المتناظر أيضاً العبور (Crossing-Over) ويسمح باندماج جين في موقع محدد من الجينوم (الشكل 4.5) ولكن هذا الاصطلاح يستعمل بشكلٍ واسعٍ عند تبادل قطع DNA بين الكروموسومات عند الانقسام الاختزالي (Meiosis). في حالة التحويل (Transformation) باستعمال البلازميد حَلَقي، إذا تم عبور منفرد يتم اندماج البلازميد كاملاً في الكروموسوم. أما إذا حصل عبور ثنائي أي مزدوج (Double

(cross-over الذي يستعمل قطعة DNA خطية (linearised) فيؤدي ذلك إلى إبدال جين كروموسومي بجين آخر ذي تسلسل متجانس (متناظر) مع التسلسل في منطقة العبور.

دخلون أو إنترون (Intron) : قطعة RNA تُقطع قبل بدء ترجمة الـــmRNA إلى بروتين. تنتشر الإنترون في مورثات الخلايا ذات النواة الحقيقية، وتندر جداً في مورثات الخلايا بدائية النوى.

المكتبة الجينية (Gene library) : مجموعة قطع DNA مُنتسَخة من الجينوم أو من cDNA.

الارتباط (Linkage) : ميل الجينات المتقاربة فيزيائياً (لجهة الموقع على الكروموسوم) بأن تُورَّث مع بعضها البعض.

مجموعة ارتباط (Linkage group) : مجموعات جينيات تُورَّث، أو تنتقل كوحدة واحدة، وهي تمثل كامل الكروموسوم.

ميتابولم (Metabolome) : مجموعة أو تشكيلة مواد الأيض التي ينتجها الكائن الحي في ظرف أو وقت ما.

مصفوفة مجهرية (Microarray) : دعامة (Support) صلبة (كشريحة مجهر زجاجية) تحتوي على شبكة (Grid) من DNA أحادي الجدلة متنوعة التسلسل تُمثل جينات الكائن الحي كلياً أو جزئياً.

مايسيليوم (Mycelium) : نمو نباتي (Vegetative) نموذجي للفطريات الخيطية يُنتج خيوطاً متشعبة.

نيوكليوتيد (Nucleotide) : وحدات بناء كل من الـــDNA والـــRNA تحتوي على قاعدة نيوكليوتيدية وسكر الريبوز (أو ديوكسيريبوز) وفوسفات غير عضوي. يُرمز للنيوكليوتيد بالقاعدة التي تحتويها. القواعد هي عائلة بيورين

(Purines) فيها أدنين A (Adenine) وجوانين G (Guanine) وعائلة بيريميدين (Pyrimidines) فيها سيتوززين C (Cytosine) و ثايمين T (Thymine) و يوراسيل U (Uracil). يحتوي الــDNA على AGCT والــRNA على AGCU.

إطار قراءة مفتوح (Open reading frame أو ORF) : مجموعة شفرات (كودون) متتالية، لا يفصل بينها شفرات توقف الترجمة (Stop codons) يُفترض أن تعطي بروتين فعال.

نقطة بدء المضاعفة (ori) (Origin) : تسلسل يحدد موقع بداية تضاعف الــDNA.

صفة ظاهرية (Phenotype) : خصائص (كيميائية حيوية أو فسيولوجية) لكائن حي وهي تُحدد بنوع الجينات.

بلازميد (Plasmid) : جزيئات DNA حَلَقية لها قدرة على التضاعف بشكل مستقل عن الكروموسومات.

صيغة صبغية (Ploidy) : عدد المجموعات الكاملة من كروموسومات الخلية. يكون العدد 1 عند الكائن الفرداني، أي أحادي المجموعة الصبغية (Haploid)، يكون العدد 2 عند الكائن الضعفاني، أي ثنائي المجموعة الصبغية (Diploid)، وعند الكائن المتعدد المجموعة الصبغية (Polyploid) يكون العدد أكبر من 2.

تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction أو PCR): عملية تضاعف أسي (مطرد exponential) لقطعة DNA (الشكل 8.4).

محرك (Promoter): منطقة سابقة للمورث على جهة ’5، وهي تسلسل يحمل إشارات بدء وتنظيم نسخ الجين.

بروتيوم (Proteome): مجموعة أو تشكيلة البروتينات التي ينتجها الكائن الحي في ظرف ووقت ما.

بروتوبلاست (Protoplasts): خلية جُردت من جدارها الخلوي بفعل أنزيمات محللة للكاربوهيدرات أو كاربوهيدرايز (Carbohydrase). تبقى الخلية محاطة بالغشاء البلازمي ما يجعلها قليلة المقاومة للضغط النَّضحي (Osmotic pressure).

التأشيب (Recombination): عملية تبادل قطع من الــDNA بين كروموسومين (أو أي جدلتين متشابهتي التسلسل) أو عملية دمج جزيء DNA بآخر (DNA غريب في كروموسوم الخلية).

أنزيم حصري (Restriction enzyme): أنزيم يقطع الــDNA على أو قرب موقع محدد ذي تسلسل قصير يسمى موقع حصري (Restriction Site).

ناقل مكوكي (Shuttle vector) : ناقل ذو قدرة على التضاعف في أكثر من كائن حي، كالبكتريا والخمائر.

وصمة ساوثرن (Southern blotting) : طريقة مخبرية يتم فيها فرز قطع الــDNA بالرحلان الكهربائي حسب أحجامها، ثم يتم نقلها على غشاء والكشف عنها باستعمال مسبار (Probe) DNA موسوم للتمكن من كشف التسلسل المكمل له. لقد سميت التقنية باسم العالم Ed Southern.

الجدِّل أو الوَّصل (Splicing): عملية تتم في النواة لقطع وإزالة الدخلون (Introns) من الــRNA والذي يتبعه لصق الخرجونات (Exons) مع بعضها البعض.

التزامل (Synteny): وجود نفس الترتيب الفيزيائي للجينات على الكروموسوم في كائنات حية مختلفة.

النسخ (Transcription): عملية تصنيع الــRNA من تسلسل الــDNA المشفر.

عامل نسخ (Transcription factor) : بروتين يرتبط بالــDNA في منطقة المحرك. أو يرتبط بعوامل بروتينية أخرى، فيقوم بضبط عملية النسخ على جين واحد أو أكثر.

إشارة وقف النسخ (Transcription terminator) : تسلسل في الــDNA يُوَقِفُ عمل أنزيم الــDNA بوليمراز ليتوقف تصنيع الــRNA.

نقطة بداية النسخ (Transcriptional Start Point (TSP)): الموقع الذي تبدأ منه عملية النسخ وتصنيع الــRNA.

ترانسكربتوم (Transcriptome): مجموعة أو تشكيلة الــRNA الرسول التي ينتجها الكائن الحي في ظرفٍ ووقتٍ ما.

تحويل أو تحوير وراثي [Transformation (genetic)] : عملية دخول DNA غريب من خارج الخلية إلى داخلها واندماجه واستقراره.

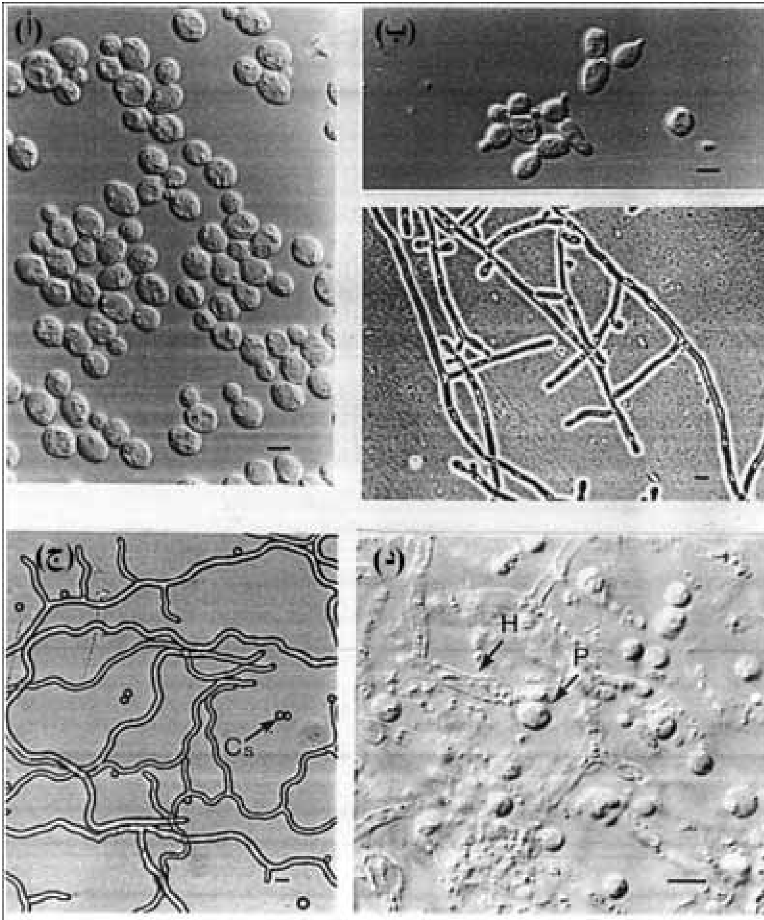
ناقل (Vector): جزيء DNA (غالباً ما يكون بلازميد) يستعمل لنقل DNA إلى داخل كائن حي.

النوع البري الطبيعي (Wild type): سلالة من كائن حي لم يتم إدخال طفرة أو تحويل وراثي في جيناته بشكل مقصود. قد يعني هذا الاصطلاح أيضاً الصفة الظاهرية لهذا الكائن الحي (Phenotype).

1.5 مقدمة Introduction

الفطريات هي خلايا ذات نواة حقيقه (Eukaryotes) تُصنَّف إلى خمائر (Yeast) وفطريات خيطية (Mycilial fungi) وذلك حسب الطبيعة الغالبة لنموها في وسط غذائي. تُعتبر أصناف الفطريات أحادية الخلية (Unicellular) خمائر (بشكل عام) وذلك لتمييزها من بقية الفطريات الخيطية. ولكن هذه الكائنات لا تلتزم بهذه الصفة قطعياً، إذ يمكنها أحياناً أن تنمو بالشكلين (أو الطريقتين)، وتسمى ازدواجية الشكل هذه بالــ Dimorphic (الشكل 1.5). في الطرق الحديثة

للتصنيف يُعتمد على المقارنة الجينية والتي تعتبر أكثر دقة للتصنيف، ولكن التشابه بين الخمائر والفطريات الخيطية يبقى كافياً لدراستهما معاً في هذا الفصل. بالرغم من التشابه المذكور، هناك اختلافات مهمة أدت إلى تطوير تطبيقات مختلفة للتقانة الحيوية تزايدت بازدياد معرفتنا بالسلالات والأصناف المختلفة وهندستها الوراثية.



الشكل 1.5: صورة أخذت بمجهر تباين الطور (Phase Contrast) للفطريات التالية: (أ) خميرة الخبز *Saccharomyces crevisiae*، (ب) ياروويا ليبوليتيكا *Yarrowia lipolytica* في حالة خميرة (أعلى اليمين)، وحالة الخيوط *(hyphae)* (أسفل اليمين) (ج) صورة بمجهر الحقل المضيء *(Bright Field)* يبين نمو الخيطي لفطر أسبرجيلس نيجر *Aspergillus niger* على طبقة سيلوفان (د) صورة بمجهر تباين التداخل التفاضلي (Differential Interference Contrast) لتكون بروتوبلاست من فطر أسبرجيلس

نيدولانس *Aspergillus nidulans* . يمكن ملاحظة تفرع الخيوط (hyphae). خط المقياس يساوي 10 مكرومتر. Cs يعني Conidiospores (تكاثر لاجنسي)، H يعني hypha أي خيطي. P تعني بروتوبلاست. الصور من "أ" إلى "ج" تقدمة Linda and James Barnett.

تم التركيز في هذا الفصل على البيولوجيا الجزيئية المرتبطة بالهندسة الوراثية للفطريات، وعلى وصف تطبيقات استخدام الفطر كمضيف لإنتاج بروتينات من جينات خارجية غريبة. العديد من الطرق المخبرية المعتمدة في هذا الفصل قد سبق شرحها في الفصل الرابع مع خلايا بدائية النوى. لن يُعاد الشرح في هذا الفصل إلا عند وجود اختلاف بين تطبيق التقنية على البكتيريا وعلى الفطر. وأهم أسباب الاختلاف بين الاثنين هو الجينوم الفطري الكبير مقارنة بالبكتيريا، وكذلك منظومة الوظائف الخلوية الأكثر تعقيداً وتطوراً بالنسبة إلى البكتيريا، إذ إنها تتشابه مع الكائنات الراقية حقيقية النواة (Higher Eukaryotes) أكثر من تشابهها مع البكتيريا. تمتلك الفطريات أغشية تغلف النواة وتحتوي على بضع كروموسومات، إضافة إلى عضيات (Organelles) أخرى محددة بغلاف يعزلها عن بعضها البعض، منها الشبكية الاندوبلازمية (Endoplasmic reticulum أو ER) التي تبدأ عملية فرز البروتينات لإرسالها إلى المواقع المطلوبة، سواء كانت خارج الخلية أو في أي من العضيات (Organelles) الخلوية. من الاختلافات الأساسية بين البكتريا والفطريات تركيبة الجدار الخلوي التي لا تحتوي على (Peptidoglycan) عند الفطريات، بينما يحتويها جدار البكتريا. يحتوي الجدار الخلوي للفطر مواد سكرية متعددة مثل كلوكان (Glucans)، مانان (Mannans)، وكايتن (Chitin)، وكايتوسان (Chitosan)، وكذلك يدخل بتركيبها بروتينات سكرية (Glycoproteins) حسب أصناف الفطر والسلالات. أما دورة حياة الفطريات فهي معقدة تمر بمرحلة نمو نباتي خضري (Vegetative) بشكل مايسيليوم (Mycelium)، يتبع ذلك مرحلة تغيير في الشكل (Morphogenesis) تؤدي إلى تكوين الأبواغ (Spores)، وذلك بطريقة جنسية (تنتج من تزاوج بين سلالتين) أو بطريقة غير جنسية. خلال تطبيقات التقانة الحيوية تُستعمل الفطريات النامية نباتياً مع انقسام نووي (Mitotic nuclear

division). لا يدخل الانقسام الاختزالي ضمن اهتمامنا هنا، ويمكن للقارئ الرجوع إلى الكتب المذكورة في نهاية الفصل عن دورة حياة الفطريات.

الجدول 1.5: تسلسل الجينوم عند بعض أنواع الفطر

الكائن	عدد الكروموسومات	حجم الجينوم Mbp[أ]	العنوان الإلكتروني [ب]
Ashbya gossypii	7	9.2	http://agd.unibas.ch/
Saccharomyces cerevisiae	16	12	http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces/
Schizosaccharomyces pombe	3	14	http://www.sanger.ac.uk/Projects/S/ pombe/
Candida albicans	8	16	http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/
Neurospora crassa	7	40	http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/
Aspirgilus nidulaus	8	30	http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/

(أ) الحجم التقريبي للجينوم الفرداني (haploid) دون DNA الميتوكوندريا

(ب) مواقع إلكترونية مقترحة تشتمل على تفاصيل. ملاحظة: عناوين المواقع قابلة للتغيير، وهناك عدد متزايد وتجديد للمواقع. هناك أيضاً مواقع توفر معلومات عامة عن الفطريات وتعطي روابط لمواقع إلكترونية عن الموضوع.

<http://www.fgsc.net>, <http://www.eurofung.net/frameset.php>, <http://www.aspergillus.man.ac.uk>

تنتظم جينات الفطريات على كروموسومات يمكن فصلها بالرحلان الكهربائي. يختلف عدد الكروموسومات بين الأصناف، وهو مساوٍ لعدد مجاميع الارتباط المتوارثة (Linkage groups) حيث تمت دراسة المؤشرات الوراثية. يبين الجدول 1.5 بعض الأمثلة على ذلك مع حجم الجينوم. إن كمية الــDNA في الفطريات أكثر بكثير منها في الخلايا البدائية النواة (هناك في *E.coli* كمية 4.7 Mbp). وسبب ذلك أن الفطريات تحتوي على جينات أكثر مشفِّرة للبروتين، وعلى DNA أكثر في الدخلونات (Introns ضمن المورث)، وبين المورثات كفواصل بين الجينات (Spacer). تقتصد البكتيريا بالــDNA غير المشفِّر مقارنة

بالفطريات، حيث نرى أن الجينات البكتريا متقاربة جداً وبعضها ملتصق بالآخر، بحيث يتم النسخ وضبط النسخ لمورثين من محرك واحد (Promoter) وهو ما يعرف بالأوبرون (الشكل 1.4) الذي لا يوجد عند الفطريات، حتى عندما تكون الجينات (المسؤولة عن وظائف متصلة) متجمِّعة ومتقاربة فيزيائياً، إذ يبقى كل جين مستقل بمحركة الخاص وسلاسل ضبط وتنظيم عمله. إن الفهم الدقيق لهذا التنظيم مهم لاعتماد مقاربة عقلانية في التحوير الوراثي للكائن الحي والتوصل إلى الصفة الشكلية المطلوبة (Phenotype). لذلك سوف نناقش أمثلة عن آليات ضبط النسخ لمسارات متعددة (Multi-pathway) أو لمسار خاص.

يتكون الكروموسوم في الكائنات الحقيقية النواة من مادة كروماتين (Chromatin) التي تحتوي على نفس الوزن من الـــDNA والبروتين (خاصة هيستونات Histones). ترتبط بروتينات الهيستون بالـــDNA لتساعد على رزمة (Packing) ووضعه بتركيب هيكلي معقد. على سبيل المثال، ترتبط هيستونات محددة بالـــDNA لتشكل جسيمات نووية أو نيوكليوسوم (Nucleosomes)، التي تُرى بالمجهر الإلكتروني بشكل "عقد حبيبات على خيط" (Beads on a string). يلعب ترتيب النيوكليوسوم دوراً في ضبط النسخ من خلال تأثيره في وصول عوامل النسخ البروتينية (Transcription) إلى المحرك والارتباط معه، وهذا المستوى من الضبط غير موجود في الكائنات بدائية النواة. إن مناقشة تفاصيل ضبط وتنظيم النسخ ليست من أهداف هذا الفصل، ولكن التذكير به يهدف إلى تبيان مستوى التعقيد في تركيب الخلايا حقيقية النوى. لحسن الحظ، وبالرغم من التعقيد، يمكننا دراسة العديد من الفطريات كما يمكن تحويرها لتقوم بإنتاج كمية أكبر من مادة ما، أو إنتاج مادة جديدة.

2.5 إدخال DNA داخل الفطر (تحويل الفطريات)

Introducing DNA into fungi (fungal transformation)

1.2.5 الأرضية الخلفية للموضوع Background

أجريت التجربة الأولى لتحويل فطر في بدايات السبعينيات عبر نقل قطع كروسوم من خلية طبيعية (Wild type) إلى أخرى تحمل طفرة ذاتية التغذية

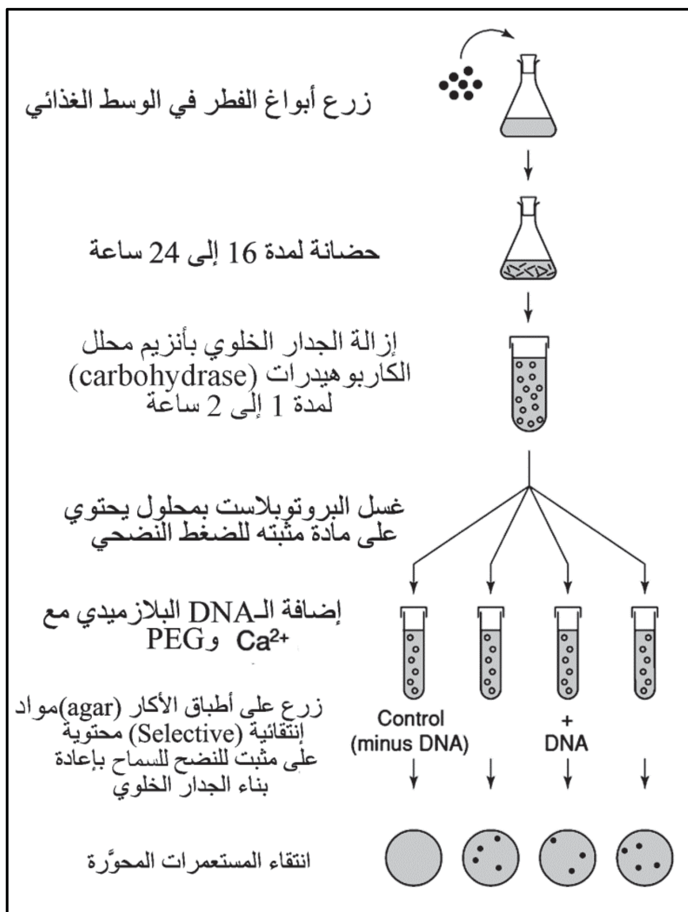
(Anxotrophic mutant)، أي أن نموها مشروط بإضافة مادة غذائية معينة إلى الوسط كحمض أميني أو قاعدة نيوكليوتيد. كي ينجح التحويل لا بد من إزالة الجدار الخلوي الذي يشكل العائق الأساسي أمام دخول الــDNA، ويتم ذلك بواسطة مزيج من أنزيمات تحليل الكاربوهيدرات، وتتحول الخلية إلى بروتوبلاستات (Protoplast) بعد إزالة الجدار (الشكل 1.5 د). يتم بعد ذلك انتقاء الخلايا المحورة بناء على قدرتها على النمو دون إضافة المادة الغذائية إلى الوسط لأنها اكتسبت الجين المطلوب من DNA الخلايا الطبيعية الداخل، وتسمى هذه العملية بالتكملة أو التتام الجيني (Genetic Complementation) أو تعويض النقص الجيني. ولكن مصير الــDNA الداخل إلى الخلية بقي مجهولاً حتى بداية الثمانينيات، إذ لم تكن التقنيات اللازمة قد توفرت بعد. بعد توفر الأدوات التقنية تم الكشف عن اندماج الــDNA الداخل بكروموسوم الفطر من خلال التأشيب الجيني (Genetic Recombination).

ثم تم تطوير طرق لنقل الجينات والتحويل في خميرة سكرومايسيس سيريفيزيي (*Saccharomyces cerevisiae*) باستعمال النواقل المكوكية التي تتضاعف وتنتشر بشكل بلازميد دون اندماج مع الكروموسوم في كل من بكتيريا E. coli والخمائر. تُسهل هذه الطريقة التلاعب بالبلازميد وازدياد كميته (عدد نُسخِهِ) في البكتيريا E. coli لتسهيل العمل في الخميرة وإجراء التحوير المطلوب. تم أيضاً تطوير نواقل مشابهة لتحويل الفطريات الخيطية، ولكن بدلاً من أن يبقى في الخلية بشكل بلازميد قابل للتضاعف فإنه في أغلب الأحيان يتحد ويتأشب مع الكروموسوم. نجحت عملية التحويل أولاً في كائنات دُرست بإسهاب ومعروفة الخصائص منها خميرة S. cerevisae، و Neurospora crassa وكذلك Aspergillus nidulans، كما ساهم في ذلك النجاح توفُّر سلالات طافرة ذاتية الاغتذاء (Auxotrophic mutants) مع قريناتها الطبيعية. ويستمر تطوير وتغيير طرق التحويل لفطريات أكثر أهمية للتقانة الحيوية، حتى لو كانت أنظمتها الوراثية غير محددة أو معروفة بشكل جيد. في حال عدم توفر طافر ذاتي الاغتذاء

لاستعمال التتام (Complementation) الجيني خلال الانتقاء في عملية التحويل، يمكن الاعتماد على مؤشرات (Markers) بديلة كمقاومة المضادات الحيوي.

2.2.5 بروتوكولات التحويل Transformation protocols

لتحويل الفطر الخيطي (إدخال DNA إلى الخلية) تبقى الطريقة الأمثل والأكثر استعمالاً هي نزع الجدار الخلوي لخيوط الفطريات لتصبح بروتوبلاست، التي تُحفظ في محلول خاص يحتوي على مُثبِّت نضح (Osmotic stabilizer) ليحمي البروتوبلاست من الانفجار (الشكل 2.5). يضاف بعد ذلك ناقل الـــDNA إلى البروتوبلاست بوجود الكالسيوم Ca^{2+} ثم يُحفز دخول الـــDNA إلى الخلية بإضافة مادة بولي إثيلين كليكول (Polyethylene glycol أو PEG) التي تُحدث ثقوباً صغيرةً في غلاف السيتوبلازم تسمح بمرور الـــDNA عبرها. هناك عدد كبير من الخلايا لا تستطيع بعد ذلك أن تُعيد بناء جدارها الخلوي، ومن الخلايا ما لا يحتوي على الناقل، لذلك لا بد من عملية فرز وانتقاء فعالة لعزل العدد القليل من الخلايا التي تم تحويلها. إن نسبة نجاح أو تردد التحويل (Transformation frequency أي عدد الخلايا المحورة لكل ميكروغرام من DNA الناقل) يختلف بشكل كبير حسب أنواع الكائنات الحية المُحوَّلة وحسب الطريقة المتبعة لعملية التحويل. بعد الابتكار الأول لطريقة التحويل المذكورة، تم إدخال تطوير وتغيير عليها زادت من تردد التحوير (نسبة النجاح) بعشرات الأضعاف. هناك طرق تحويل بديلة تتحاشى إزالة الجدار وتكوين البروتوبلاست، كطريقة استخدام أسيتات الليثيوم (Lithium acetate) على خلايا خميرة كاملة، وطريقة الثقب الكهربائي (Electroporation) للأبواغ النابتة، وطريقة الانتقال بالقصف، أو الانفجاري (Biolistic transformation) للمايسيليوم. لقد أعطت تلك الطرق نجاحات متغيرة، ولكن استعمالها محدود لجهة تنوع الأصناف القابلة للتحوير، وكذلك للاحتياج إلى أجهزة وأدوات خاصة في بعض الأحيان. يبين الجدول 2.5 قائمة بتلك الطرق وخصائصها.



الشكل 2.5: بروتوكول نموذجي لتحويل بروتوبلاست مشتق من فطر خيطي. بعد جمع المايسيليوم المصفى يعاد مزجه في سائل يحتوي على مثبت للضغط النضحي مثل سوربيتول (Sorbitol) أو كلورايد البوتاسيوم (KCl) لتفادي انفجار البروتوبلاستات. يمكن أن يحتوي الوسط الغذائي، في الأكار المستعمل لعملية الانتقاء، عوامل النمو الضرورية فقط حيث يتم تعويض العامل الغذائي الناقص بالجين المولج في الخلايا، كما يمكن أن يحتوي على مضاد حيوية يساعد في عملية الانتقاء. في هذه الحالة يُترك الوقت للمتحورات (transformants) لإعادة بناء الجدار الخلوي قبل إضافة مضاد الحيوية إلى الوسط الغذائي. PEG يرمز إلى Polyethylene glycol.

3.2.5 نواقل التحويل Transformation vectors

تُصممَّ النواقل لإدخال الـــDNA إلى الخلية، ثم لتجعل الـــDNA المنقول إما أن يندمج مع كروموسوم الخلية المستقبلة وهو التحويل الاندماجي

(Integrative transformations)، أو أن يبقى مستقراً كبلازميد فيها. في حالة التحويل الاندماجي، إما أن يكون الالتحام بموقع معين على الكروموسوم متشابهاً في التسلسل مع جزء من البلازميد (اندماج بالتأشيب المتجانس Homologous recombination)، أو أن يتم التلاحم بشكل عشوائي في أكثر من موقع، وهو الاندماج في موقع غير محدد (Ectopic). يحتوي الناقل المكوكي على جينات تسمح بالانتقاء في كل من البكتيريا والخمائر. كما يحتوي على تسلسل بدء المضاعفة (Ori) للتضاعف في البكتريا وآخر للتضاعف في الخمائر. يُبين الشكل 3.5 النمط لناقل مكوكي في الخميرة قادر على البقاء كبلازميد بدون اندماج وآخر يندمج في موضع محدد من الكروموسوم.

ومن أجل تمييز الخلايا المُحوَّرة فقد صُمِّمت النواقل لتحتوي على جين مؤشر (Selection markrs) يميزها ويساعد في انتقائها بناء على ميزة خاصة. تصنف الجينات المؤشرة إلى ثلاثة أنواع. أولاً هناك جينات مُتَمِّمة للنقص الغذائي تم انتساخها من الفطريات البرية الطبيعية، يقوم بتكميل طفرة اغتذاء ذاتي (Auxotrophic mutation) كما تمّ توضيح ذلك مسبقاً. في معظم الأحوال يقدر الجين المُتمم (المأخوذ من صنف فطر معيّن) على تعويض النقص الغذائي لعدة أنواع من الفطريات ذات الطفرة المناسبة من خلال Heteregonous transformation. ولكن بعض أنواع الفطر لا تنجح في عملية التتام إلا إذا كان الجين مأخوذاً من نفس الصنف فيتم تعويض النقص من خلال Homologous transformation. وعند عدم توفر السلالة التي تحمل الطفرة المناسبة فهناك النوع الثاني من الجينات المؤشرة المقاومة للمضادات الحيوية مثل هايكرومايسين B (Hygromycin B)، أو فليومايسين (Phleomycin)، أو كناميسين (Kanamycin) أو بينومي (Benomy). هناك مشكلة مع هذا النوع من المؤشر وهي أن الفطر المستعمل يجب أن يكون حساساً بدرجة مقبولة للمضاد الحيوي الذي يؤدي المؤشر إلى مقاومته. على سبيل المثال على هذا النوع من المؤشرات، هناك جين مقاومة الكنامايسين من البكتيريا، الذي يعمل بشكل ضعيف عند استعمال

محركه الخاص في خلية الخميرة. وبهدف الحصول على مستوى عال من مقاومة المضاد الحيوي يتم استبدال المحرك البكتيري بمحرك من الخميرة. بالنسبة إلى الفطر الخيطي أيضاً، يجب استعمال محرك من فطر للحصول على أفضل أداء لجهة مقاومة المضاد الحيوي. وأخيراً هناك المجموعة الثالثة من المؤشرات في النواقل، التي تُمَكِّن الخلايا من النمو باستعمال مصدر كربون أو نيتروجين لا تستطيع بالأصل أن تستعمله. وخير مثال على ذلك هو جين amdS المشفِّر لأنزيم أسيتاميديز (Acetamidase) في الفطر A. nidulans، الذي يجعل الخلايا (التي تحتوي المؤشر) تنمو بشكل جيد على مصدر نيتروجين وحيد هو أكريلمايد (Acrylamide) أو أسيتامايد (Acetamide). لقد أُدخل هذا الجين في عدد من سلالات فطر Aspergillus وTrichoderma spp. وهو مفيد بشكل خاص للتحوير الذي يحتوى على نُسَخ متعددة من الناقل المندمج داخل خلية المضيف.

تستقر وتدوم النواقل البلازميدية داخل الخلايا المحورة إذا أبقيت الخلايا في ظروف الضغط الانتقائي المناسبة، مثلاً استمرار توفُّر المضاد الحيوي في الوسط الغذائي. عند توقف الضغط الانتقائي (زوال المضاد الحيوي) فإن الخلية المحورة تفقد البلازميد بسرعة نسبياً وذلك لعدم حاجتها إلى بقائه. ولا بد لكل النواقل البلازميدية أن تحتوي على تسلسل (Ori) لبدء المضاعفة، الذي قد يكون مصدره من بلازميد أو من كروموسوم. وإن الناقل الذي يحمل تسلسل (Ori) مصدره من الخمائر، يمكن أن يعمل في أصناف كثيرة من الخمائر، وبكفاءة مختلفة أحياناً. بما أن عدد نُسَخ الناقل البلازميدي قد يصل إلى 200 نسخه بالخلية الواحدة، فإن هذه وسيلة لمضاعفة الجين المستهدف وإنتاج عال من البروتين الناتج منه. من مساوئ هذا النظام ضرورة إبقاء ضغط الانتقاء لضمان ديمومة البلازميد وعدم اختفائه، أي أن المحفوظة على الخاصية المرغوبة في الخلية قد يكون صعباً، وخاصة في خميرة S. cerevisiae. وعلى العكس ففي خميرة Kluyveromyces lactis هناك بعض أنواع البلازميدات غير المدمجة بالكروموسوم التي تبقى ثابتة في الخلية بدون استمرار ضغط الانتقاء.

الجدول 2.5 : طرق تحوير الفطريات			
الطريقة أو المعالجة	**مثال على فطر تم تحويله**	**تردد التحويل[1]**	**ملاحظات**
	S. cerevisiae, Pichia pastoris	$10^5–10^2$	الأكثر استعمالاً ولكن تردد التحويل قليل مع الفطر الخيطى
بروتوبلاست باستعمال $CaCl_2$/PEG[2]	*Aspergillus nidulans, A. niger, Trichoderma reesei, Mucor circinelloides*	$10^3–10^0$	
بروتوبلاست باستعمال الثقب الكهربائي[3] Electroporation	*S. cerevisiae، A. niger, T. reesei*	10^3-10^0	يمكن أن تعطي نفس كفاءة الطريقة السابقة
خلية كاملة باستعمال الثقب الكهربائي Electroporation	*S. cerevisiae، A. niger, A.Oryzae, Neurospora Crassa*	10^3-10^0	للحصول على أفضل نتيجة مع الفطر الخيطي، يجب استعمال أبواغ conidiospores نابتة (Germination) أُضعِف جداره الخلوي
كامل الخلية مع LiAc[4]/ PEG	*S. cerevisiae, Yarrowia lipolytica*	10^7-10^3	تَطبَّق على بعض أصناف الخمائر وتعتبر غير فعاله مع الفطريات الخيطية
كامل الخلية مع Biolistics[5]	*S. cerevisiae, A. nidulans، N. crassa، Trichoderma harzianum*	10^3-10^0	أقصى فعالية مع خلايا خمائر كاملة وأبواغ conidiospores وبمكن استعمالها أيضاً مع مايسيليوم Mycelium
بروتويلاست أو خلايا كامله مع Agrobacterium tumefaciens[6]	*S. cerevisiae, Aspergillus awamori, T. reesei، N. crassa*	(أ)10^4-10^2	نفس الكفاءة مع البروتوبلاست وأبواغ conidiospores ولكن تردد التحوير يختلف بين الأنواع

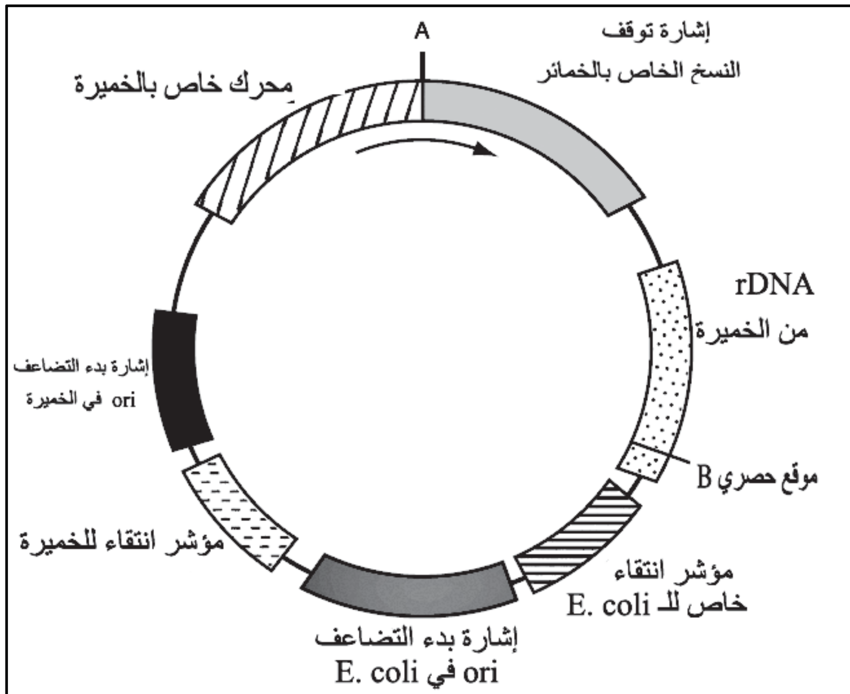
[1] عدد الخلايا المتحورة لكل مكروغرام واحد من DNA الناقل. تتغير قيمة التردد حسب الكائن الحي ونوع الناقل وطريقة التحويل.

[2] Polyethylene glycol

[3] ادخال الــDNA إلى الخلية بواسطة نبضة قصيرة لحقل كهربي عالي التوتر.

[4] Lithium acetate

[5] طلقات من كريات معدنية (ذهب أو تنكستن) مطلية بالــDNA المطلوب تُقذف بها الخلية المضيفة بسرعة عالية في جو فارغ (vacuum).
[6] يتم نقل الــDNA من البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* إلى الفطر، كما يحصل عند تعديل النباتات وراثياً.
(أ) يُحسب التردد في هذه الحالة لكل 10^7 خلية.



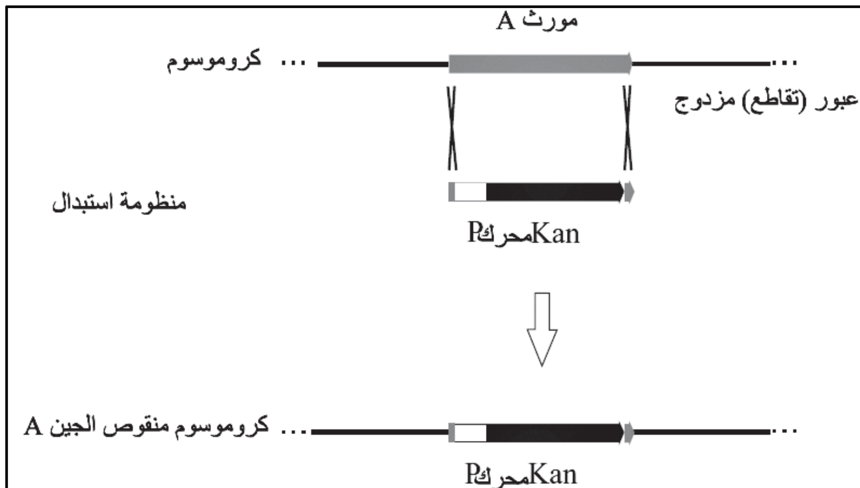
الشكل 3.5: نمط ناقل تعبيري مكوكي بين الخميرة والــ*E.coli* يبين موقع بدء التضاعف (ori) الفعال في الخمائر وبكتيريا E. coli، مؤشر الانتقاء وموقع الانتساخ A يمثل الموضع حيث يُقحم تسلسل الجين المستهدف والمراد تعبيره. من أجل توجيه هذا البلازميد ليندمج مع كروموسوم المضيف في موقع محدد، يضاف في الناقل تسلسل من جين تشفير RNA رايبوسومي (rDNA). الموقع B ضمن الــ rDNA هو موقع أنزيم حصري ضروري لتحويل البلازميد من شكل حلقي إلى خطي، لأن ذلك يزيد من فعاليته وإمكانية اندماجه مع التسلسل المتجانس له ضمن منطقة الــ rDNA على الكروموسوم.

إن اندماج البلازميد مع كروموسوم الخميرة يؤدي إلى ثبات واستقرار الجين داخل المضيف، ولكن عدد نُسَخ الجين الذي أدخل يكون قليلاً. من الطرق المتبعة للتوصل لهذا في خميرة S. cerevisiae هناك عملية توجيه البلازميد إلى تسلسل الــDNA المشفر للــRNA الرايبوسومي (أي Ribosomal DNA) الذي يتواجد

في الجينوم بعدد نُسَخ متتابعة متعاقبة (tandem) لا يقل عن 150 نسخة في الجينوم. إن التحام الــrDNA في البلازميد (الشكل 3.5) يساعده على الاندماج مع الكروموسوم المضيف (بالتأشيب المتجانس التقاطعي) في مواقع تشابه التسلسل (أي موقع rDNA)، خاصة إذا ما تم مسبقاً قطع البلازميد في وسط تسلسل الــrDNA ليتحول إلى شكل خطي يحمل أجزاء من rDNA على أطرافه. يمكن أن نزيد من عدد نُسَخ الجين المندمج من خلال وضع الجين المؤشر (المسؤول عن الانتقاء) بعد محرك ضعيف (أو مُضعَّف). من خلال ضغط الانتقاء تساعد هذه الطريقة على زيادة عدد النسخات المدمجة من الجين المطلوب بهدف ضمان زيادة إنتاج البروتين المستهدف إلى حد مقبول.

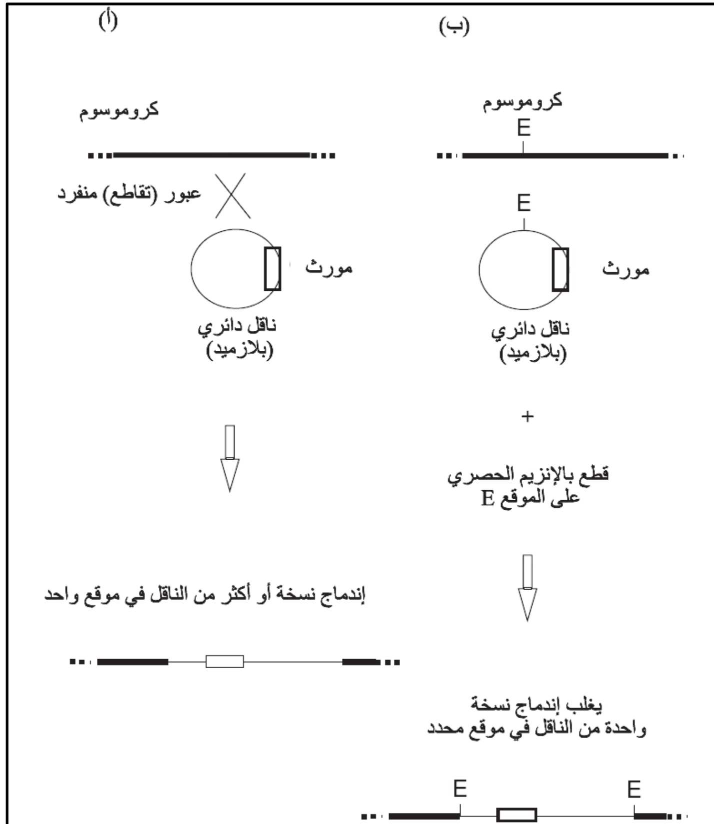
إن النواقل التي تندمج بالكروموسومات لها عدة استعمالات خلال عملية تحوير الفطريات. فبالإضافة إلى زيادة عدد نُسَخ الجين المطلوب على الكروموسوم، يمكن استعمال هذه النواقل لتعطيل أو استبدال مورث معين. ففي خميرة S. cerevisae "يمكن استعمال ناقل يحمل "كاسيت الاستبدال" لمحو أي جين في الخميرة (من بين جيناتها المعروفة والتي تُقارب 6000 مورث التي تم الكشف عنها بعد تحديد سلسلة الجينوم الكامل)، وذلك بهدف دراسة الجين من الناحية الوظيفية. يحمل "كاسيت الاستبدال" مورث مقاومة الكنامايسين (G418) مزروعًا على طرفيه تسلسل خاص محدد ومتماثل مع طرفي الجين المراد محوه، ويمكن قطع الكاسيت بواسطة أنزيم حصري. إن التأشيب المتجانس بين طرفي الكاسيت مع التسلسل المتجانس في الجين المستهدف يؤدي إلى محوه (الشكل 4.5). في هذه الدراسات يتم محو جين أو مجموعة جينات من الخمائر، ثم يتم البحث عن التغيرات الشكلية الظاهرة (Phenotypes) نيجة المحو، علماً أن مَحْوَ مورثٍ ما لا يؤدي دائماً إلى تغيرات شكلية قابلة للكشف. لقد أنجِز محو مُمنهج لجينات *S. cerevisiae* باستعمال التأشيب المتجانس بواسطة تسلسلات DNA تم انتاجها بالــPCR. وقد لوحظ بأن التأشيب المتجانس أسهل في الخمائر منه في الفطريات الخيطية، حيث إن هذه الأخيرة تتميز بتدني تردد التحويل إجمالاً

(Transformation frequency) (بالتأشيب المتجانس)، وبضرورة استعمال تسلسل DNA متشابه طويل (على أطراف الجين المؤشر والجين المستهدف)، أطول مما هو معتمد في الخميرة. في الخمائر، تم التأشير (Tagging) لكل عملية محو لجين بتسلسل DNA فريد يسمى (Bar-code).



الشكل 4.5: محو (deletion) جيني في خميرة S. cerevisiae باستخدام كاسيت الاستبدال كنمايسين (G418). تحتوي كاسيت الكنمايسين (G418) على جين مقاومة الكنمايسين (Kan) الذي يعمل تحت سيطرة محرك فطري (P) وتسلسل متدلي قصير حوالى 40 bp (باللون الفاتح) على نهاية الجين قيد المحو. تتم عملية محو الجين من خلال عملية تأشيب متجانس (homologous recombination) بالعبور (أو التقاطع) المزدوج (double cross-over) بين هاتين النهايتين والكروموسوم ما يؤدي إلى محو الجين. في موقع العبور يتم قطع أنزيمي لتسلسل DNA الكروموسوم، ثم تتبادل الأطراف وتلتحم مع أطراف الكاسيت بعملية تصليح للــDNA (DNA repair mechanism). وبما أن الكثير من الجينات تُعد ضرورية لبقاء الخلية حية، فإن عملية المحو الجيني تُطبق في بادئ الأمر على خلايا ضعفانية أي ثنائية المجموعة الصبغية (diploid) حيث تم محو نسخة واحدة من نسختي الجين وتبقى الثانية سليمة. ثم يتم انتقاء خلايا الخميرة المحورة عبر تنميتها على وسط غذائي تحوي على المضاد الحيوي G418 والذي هو أكثر فعالية من الكنمايسين على الخمائر. ثم نضغط الخلايا المنتقاة لبدء عملية التبويغ (sporulation) بالانقسام الاختزالي لتنتج أبواغاً فردانية، أي أحادي المجموعة الصبغية (haploid)، نصفها يحمل الطفرة المنشودة (الجين الممحو). من خلال تحاليل للنمو تتم دراسة لوظيفة الجين الممحو ومدى ضرورته وأهميته في الخلية.

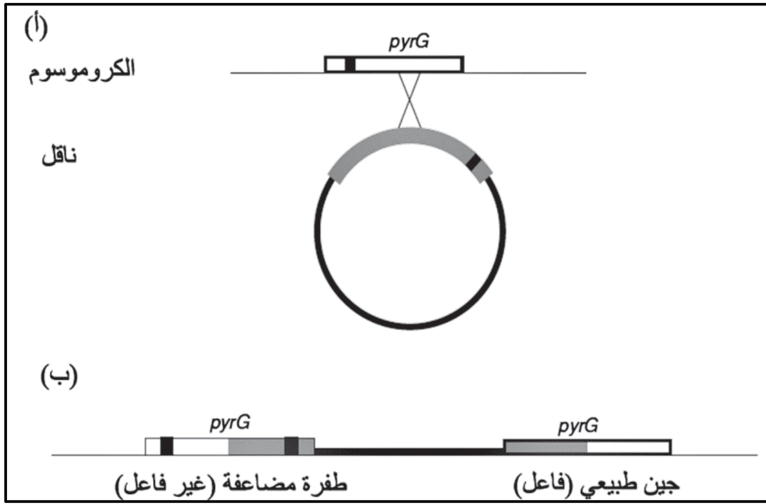
تَعتمد معظم النواقل المستعملة في تحوير الفطريات الخيطية على عملية اندماج عشوائي ذي تردد تحويل ضعيف نسبياً في معظم الحالات. من إحدى المحاولات لتحسين تردد التحويل هناك استعمال الاندماج المُساعَد بالأنزيمات الحصرية (Restriction enzyme-mediated integration أو REMI) حيث يتم إدخال البلازميد إلى الخلية بالتزامن مع الأنزيم الحصري الذي يقوم (انظر الفصل 4) بقطع البلازميد في موقع وحيد، بالتالي يتم توجيه البلازميد المقطوع (الخطي) كي يندمج في موقع DNA على الكروموسوم متجانس (يُقطع بنفس الأنزيم). ففي حين أن الطريقة المعيارية الأولى تُنتِج في الغالب اندماج نُسخٍ عديدة متلاصقة من الناقل (في موقع واحد من الجينوم أو أكثر)، فإن طريقة REMI تؤدي في الغالب إلى اندماج نُسخٍ منفردة من الناقل في مواقع كثيرة من الجينوم (الشكل 5.5).



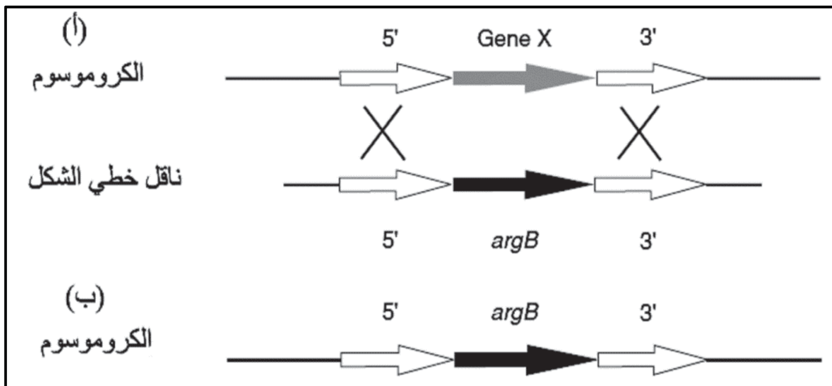
الشكل 5.5: اندماج عشوائي لبلازميد في كروموسوم فطر خيطي (أ) اندماج عشوائي في موقع خاطئ (Ectopic) ناتج من عبور (تقاطع) تسلسلات DNA ذات درجة تشابه متدنية، ما يؤدي

إلى الاندماج في بعض المواقع على الكروموسوم. بسبب طبيعة عملية التأشيب يُنتِج الالتحام تضخيم الناقل كله (مضاعفة أو أكثر من مضاعفة) في موقع الالتحام. (ب) اندماج مُساعَد بالأنزيمات الحصرية (Restriction enzyme-mediated integration أو REMI) حيث تضاف كمية كبيرة من أنزيم حصري محدد (ذو موقع واحد في البلازميد) للخلية مع الناقل خلال التحويل. يُتوقع دخول الأنزيم مع الـــDNA إلى النواة حيث يقطع الموقع الحصري على نقاط عدة من الكروموسوم. في نفس الوقت يتحول الناقل من الشكل الدائري إلى شكل خطي، ما يعطي المجال للاندماج مع مواضع عدة في الكروموسوم. مقارنةً بالإندماج العشوائي تسمح هذه الطريقة بدمج عدد أكبر من جزيئات الناقل في مواضع أكثر في جينوم الفطر (نسخة واحدة في كل الموضع). ولكن بسب العشوائية هناك مواقع لا تحظى بنسخة من الناقل.

إن مدى نجاح الجين المندمج بإنتاج البروتين المطلوب يعتمد على موقع الاندماج في جينوم الخلية المضيفة. لذلك تم تطوير طرق لتوجيه الجين قيد الاندماج إلى موقع خاص على الكروموسوم لضمان تعبير فعال. أحد تلك الطرق تم تطويرها على صنف *Aspergillus spp* وتعتمد على استعمال جين ذي طفرة معينة محمول في ناقل اندماجي وإدخاله إلى سلالة تحمل طفرة مختلفة في تسلسل آخر على نفس الجين. ينتج الجين السليم (من دون طفرة) فقط إذا حصل تأشيب متجانس بعبور (تقاطع) منفرد بين الجين الطافر على الناقل والجين الطافر الآخر في الكروموسوم (الشكل 6.5). يكون تردد التحويل هنا متدنياً، ولكن من بين الخلايا المتحولة تكون نسبة حوالى 40% قد تم فيها التحوير في موقع الجين المطلوب وأنتج النسخه السليمة من ذلك الجين. إن استعمال بلازميد حلَقي الشكل، يحمل الجين المؤشر المناسب، لتعطيل جين محدد (Specific gene disruption) في الفطريات نادراً ما يؤدي المطلوب. فلا بد من استخدام الشكل الخطي للناقل (المقطوع بأنزيم حصري ذي موقع وحيد) لتعطيل مورث معين ومحوه في الفطر الخيطي، ويجب أن تُضاف على طرفي الناقل تسلسلات (طولها عادةً أكثر من 1 kb) متجانسة (متشابهة) لطرفي الجين قيد التعطيل. ولا بد للناقل أن يكون خطيَّ الشكل، كي يتم التأشيب. تبلغ نسبة نجاح التأشيب المتجانس بعبور (تقاطع) مزدوج من 1 إلى 50% حسب طبيعة الجين وصنف الكائن الحي (الشكل 7.5).



الشكل 6.5 : التحام موجه لموقع (PyrG locus) الذي يحمل شفرة أنزيم إزالة الكربوكسيل من أوروتيدين ´5 فوسفات (orotidine−5´ phosphate decarboxylase) في فطر *Aspergillus awamori*. تحتوي السلالة المضيفة من *A. awamori* على نسخة مطفرة غير فاعلة من الجين PyrG غير فعال بحيث لا تستطيع تركيب اليوريدين (Uridine) وتتطلب وجوده في الوسط الغذائي ليتسنى لها العيش. توجد في الناقل نسخة من PyrG غير فاعلة لأنها تحمل طفرة، ولكنها بموقع على تسلسل الـــDNA مختلف عن الطفرة في السلالة المضيفة. وبطريقة التأشيب المتجانس (عبور منفرد) (أ) يندمج الناقل كله في موضع PyrG مُنتِجاً نسخة فعالة PyrGgene فعال. (ب) يتم العبور (التقاطع) المنفرد من خلال قطع والتحام الناقل والكروموسوم بميكانيكية تصليح الـــDNA ــ DNA Repair mechanism) كما في الشكل 4.5). ويتم انتقاء خلايا الفطر المحوَّر بناء على قدرتها على النمو في وسط غذائي بدون إضافة يوريدين.



الشكل 7.5 : محو أو إزالة جين معين من جينوم الفطر الخيطي. يتم انتساخ التسلسل السابق للمورث X (قيد المحو) من جهة ´5 والتالي له من جهة ´3 (بطول 1 kb لكل جهة) ثم يدمجان

بطرفي مؤشر انتقاء (selectable marker) في الناقل، مثلاً جين argB من فطر *A. nidulans* والذي يحمل شفرة الأنزيم Ornithine carbamoyl transferase الضروري للتركيب الحيوي للأرجنين (Arginine). يتم تحويل البلازميد (ذي الشكل الدائري) إلى شكل خطي من خلال قطعه بأنزيم حصري ذي موقع حصري وحيد في الناقل. ثم يتم تحويل سلالة من الفطر حامل طفرة في argB بواسطة الناقل الخطي. ينتج من ذلك حصول تأشيب المتجانس بعبور (تقاطع) ثنائي (على مستوى الطرفين ´5 و´3) كما يبين الشكل 4.5 (أ)، والذي يؤدي إلى استبدال الجين X على الكروموسوم بالجين argB المؤشر (marker) (ب). تُنتقى المتحورات من الفطريات القادرة على النمو في وسط غذائي دون إضافة الأرجينين.

3.5 استنسال أو كلونة الجين Gene cloning

إن النجاح في عزل جينات الفطريات ودراسه خصائصها لا زال يختلف بشكل كبير بين أصناف الفطر المراد دراستها. تم اعتماد مقاربات عديدة لتجاوز الصعوبة الناجمة عن عدم توفر المعلومات الجينية الكافية عن أصناف فطر ذات أهمية في التقانة الحيوية. لا شك أن استعمال السلالات الطافرة من الفطر شكلت الحجر الأساس في عملية انتساخ الجينات، حيث يتم تحويل سلالات طافرة إلى الشكل الطبيعي بواسطة إدخال DNA، هذا ما يمكن من تحديد وظيفة مورث ما. هناك خيارات أخرى متوفرة تعتمد على تحليل المعلومات المتوفرة عن التسلسل للمورث في قواعد المعلومات (Database)، علماً أنها لا تُغني عن الدراسة الوظيفية لكل جين مُنتَسَخ. بالنسبة إلى بعض الجينات يُعتبر الانتساخ التعبيري مناسباً وفعالاً لهذا الهدف، إذ يتم إدخال وظيفة أيضية جديدة للخلية ثم ملاحظة التغيرات الناتجة، التي يمكن الكشف عنها بتقنيات مخبرية بسيطة. نعرض فيما يلي مبادئ أساسية لتلك الطرق.

1.3.5 عزل الطافرات Mutant isolation

إن التتام الجيني (Complementation) لطفرة محددة هو الوسيله الأكثر فعالية لعزل جين معلوم الوظيفة، ولكن الحصول على هذا النوع من الطفرات يبقى مشكلة في كثير من السلالات الفطرية ذات الأهمية. تبقى العوامل الفيزيائية والكيميائية المُطفِّرة (مثلاً الأشعة فوق البنفسجية و نيتروزوغوانيدين

(Nitrosoguanidine) مهمة لإحداث طفرات في الفطريات إذا توفرت طريقة سهلة لتشخيص الطفرة المستهدفة كاختبار القدرة على النمو (Growth tests). وبما أن طفرات في جينات مختلفة من المسار تؤدي إلى نفس النتيجة بما يتعلق بالاحتياجات الغذائية ومتطلبات النمو، فلا بد من اختبار قدرة الكائن على استعمال مواد أولية مختلفة كي نتأكد من الطفرة التي حصلت والجين الطافر.

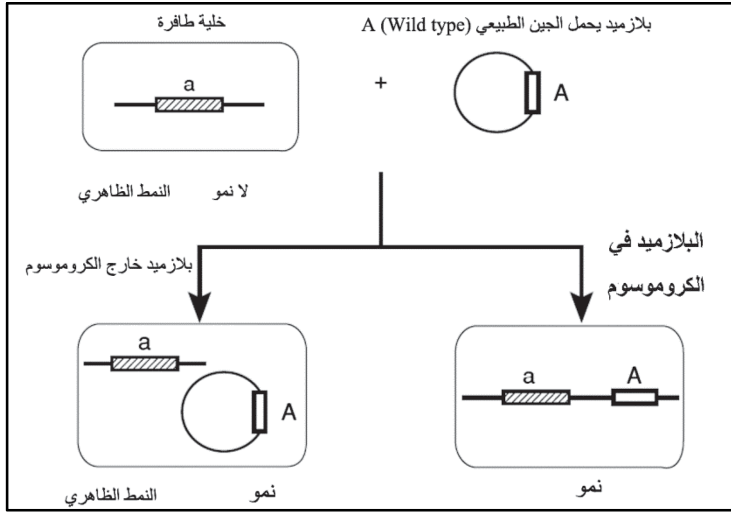
ولكن من مساوئ استعمال العوامل الفيزيائية والكيميائية المُطفِّرة هو إمكانية التسبب بأكثر من طفرة في الخلية الواحدة. فيصبح عندها من الصعب الربط بين الصفة الناتجة والطفرة المُسبِّبة. لذا طُوِّرت طرق بديلة في خميرة *S. cerevisiae* و *A. nidulans* و *N. crassa* التي أمَّنت منظومة يمكن استعمالها مع أصناف فطرية لم تخضع لدراسات مستفيضة على المستوى الجيني. إن التطفير بزرع قطعة من DNA في الجين بحيث يتغير التسلسل ويعطل الجين (Insertional Inactivation)، أو بحذف كامل الجين هي الطريقة الأفضل للحصول على طفرة محددة. لهذا الهدف يمكن استعمال النقلون أو ترانسبوزون (Transposon) وهو قطعة DNA طبيعية قادرة على التنقل من موقع إلى آخر على جينوم المضيف في أصناف كثيرة. مثلاً، يُستعمل ترانسبوزون Ty بنفس الطريقة في S.cerevisiae وهناك ترنسبوزون آخر مشابه في الــ *Schizosaccharomyees pombe* و *Candida albicans* وخمائر أخرى. وكما ذكرنا مسبقاً، فقد تم تحديد التسلسل الجيني لعدد من السلالات الفطرية، لذا فالخطوة التالية هي التكهن بموقع الجينات ضمن الجينوم، وبعد ذلك تُحدد هوية الجين ووظيفته. وقد تم التوصل إلى ذلك على مستوى كل الجينوم في خمائر عدة باستعمال ترانسبوزون بكتيري (Tn7) المسبب للطفرات. بالرغم من صعوبات استخدامها في الفطريات الخيطية، تبقى طريقة ترانسبوزون واعدة بالنجاح. هناك طرق أخرى لتعطيل جين محدد منها الــREMI التي سبق ذكرها في المقطع 3.2.5.

من الضروري أن تؤدي الطفرات إلى شكل ظاهر (Phenotype) سهل التشخيص كي يتم مسح سريع لعدد كبير من المستعمرات. مثلاً، عملية البحث عن مادة مفرزة خارج جسم الخليه تُعتبر وسيلة سهلة للبحث عن الخلية الحامله للطفرة المناسبة. تستعمل كثيراً أطباق أكار (Agar) تحتوي على مواد أولية تسمح بظهور منطقة صافية (Clearing zones) أو ملونة حول المستعمرة المحورة، خاصة

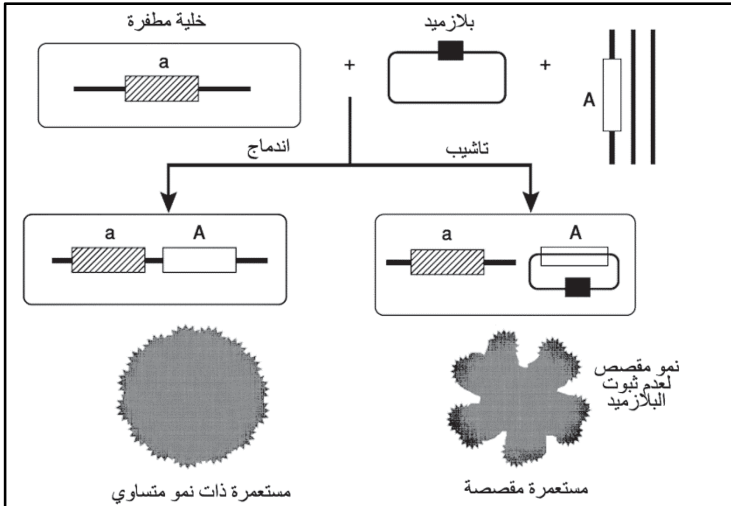
خلال عزل الجينات المشفرة لأنزيمات تُفرز خارج الخلية التي تُخولها العيش بنمط Saprophytic المميِّز للفطريات الخيطية. كما تُستعمل أطباق أكار (Agar) تحتوي على النشاء (Starch) كمصدر كربون وحيد، وذلك للكشف عن وجود أنزيمات أميليز المحللة للنشاء (Amylases). وهكذا فهناك استراتيجية خاصة بكل نوع من أنواع الطفرات. على سبيل المثال يمكن استخدام تموضع البروتين في الخلية، فإذا قمنا بدمج تسلسل إشارة الإفراز مع بروتين يعمل عادة في السايتوبلازم، هنا لن تعيش الخلية لأنه سيتم إفراز البروتين إلى خارج الخلية، أما إذا حصلت طفرة في مورث مسؤول عن عملية الإفراز، عندها يمكن انتقاء الخلايا التي تقدر أن تعيش لأن عملية إفراز البروتين السيتوبلازمي لم تتم.

2.3.5 تتام (تكملة) الطفرات Mutant complementation

يمكن دمج قطع الـــDNA التي تمثل بمجملها كامل جينوم لكائن حي في ناقل وإنتاج مجموعة كبيرة من جزيئات الـــDNA تسمى المكتبة الجينية. تُطبق عملية التكملة (التتام) لطفرة محددة باستعمال مكتبة جينية من DNA فطري، وقد أثبتت نجاحاً فقط في الأصناف *S. cerevisiae* و*A. nidulans* حيث يكون تردد التحويل عالياً (الشكل 8.5). إن بعض منتجات الجينات لا تتغير بين الأصناف والأنواع، أي أنها بروتينات "محفوظة" (Conserved) ويمكن استعمالها في إطار بكتيري. لذلك فقد تم انتساخ مورثات من الفطر عبر عملية تتام (Complementation) طفرات في بكتيريا الـــE. coli، ولكن التتام في خلية فطر يبقى هو الأصل. تعتبر الطريقة الأضمن لدراسة وظيفة جين معين هي عبر اندماج نسخة واحدة من الجين المطلوب في DNA الفطر المضيف. يمكن إدخال DNA دائري (بلازميد) إلى عدد كبير من الخمائر مثل *S. cerevisiae* وبعض أنواع الفطريات الخيطيه إلى داخل الخلية حيث يمكن أن يتضاعف ويتواجد بعدة نُسَخ. ولكن ذلك يؤدي في بعض الأحيان إلى حصول عملية تتام للطفرة بواسطة جينات متقاربة مع بعضها البعض (غير متطابقة)، وبالتالي نحصل على فكرة مغلوطة عن وظيفة المورث.



الشكل 8.5: التكملة والتتام للجين الطافر "a" في خلية بواسطة الجين الطبيعي "A" المنقول على البلازميد. الجين الطافر a بشكل (▨) والجين الطبيعي A بشكل (▭). وجود الجين داخل الخلية بشكل مندمج مع الكروموسوم أو بشكل بلازميد يسمح بنمو الخلية بشكل طبيعي.



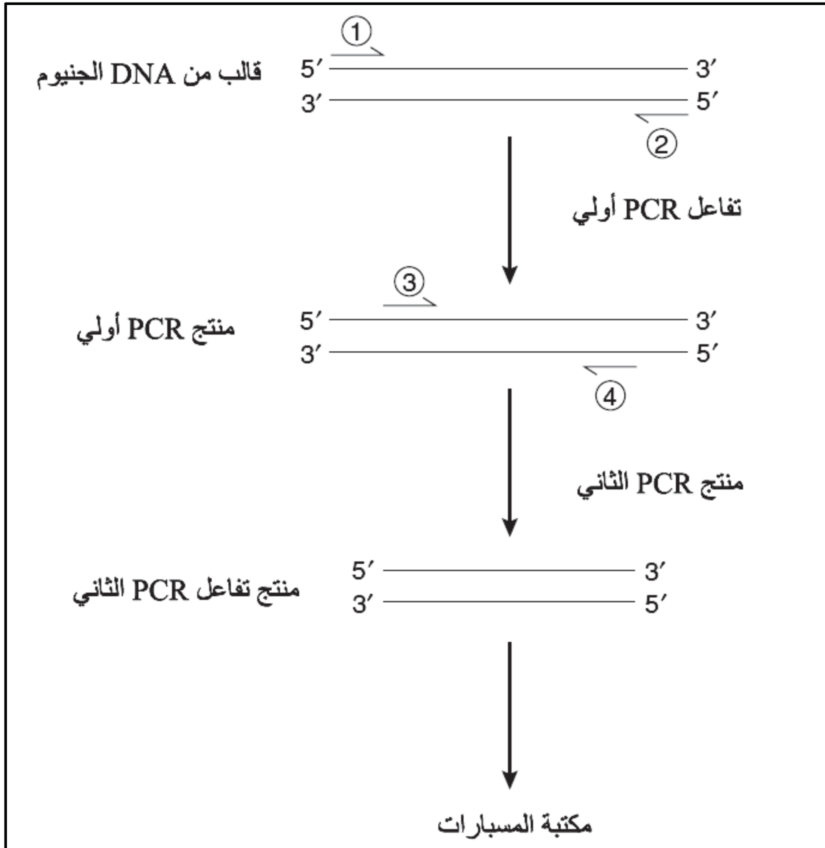
الشكل 9.5: طريقة انتساخ الجين باستعمال التكملة أو التتام لطفره معينة في فطر خيطي. يمثل الشكل (▨) الجين المطفر a، يمثل الشكل (▭) الجين الطبيعي السليم A على الــDNA الجينومي ورمزه (−). يمثل الشكل (■) موقع بدء التضاعف Ori للفطر موجود على البلازميد. يُنتج التأشيب بين الجينوم والبلازميد عدم استقرار في توارث الجين A والذي يسبب شكلاً مقطعاً للمستعمرات (Sectored)، حيث تنمو الخلايا التي تحتوي البلازميد ويتوقف نمو الأخرى ما يؤدي إلى ذاك الشكل. لذلك يمكن عزل البلازميد من المستعمرات المقصصة.

يقل تواجد البلازميد الذي يتضاعف خارج الكروموسوم (بدون اندماج) في الفطريات الخيطية بمقارنة بالخمائر. بالرغم من ذلك يمكن استعمال هذا البلازميد لاستكشاف بعض الجينات الفطرية القادرة على تتام طفرات محددة (الشكل 9.5). مثال على ذلك، نحصل على نوعين من المحوَّرات عند تحويل سلالة طافرة من *A. nidulans* بمزيج من بلازميد (يحتوي فقط على جين مؤشر يعمل في البكتريا وموقع بدء التضاعف (ori) الخاص بالفطريات) وقطع خطية من DNA جينوم الفطر (قيد الدراسة). أما النوع الأول من المحورات فيُظهِر شكلاً طبيعياً (Wild type phenotype) على الأطباق، وَينتج عن اندماج مباشر للـــDNA المتمم في كروموسوم *A. nidulans*. أما النوع الثاني فيُظهر نمواً غير متساوٍ ضمن المستعمرة الواحدة على الطبق، بحيث تتكون من مقاطع (Sectors) بعضها يبدو طبيعيا والبعض الآخر طافراً. ينتج النمو المُقطع هذا من التأشيب الحاصل بين مصدرين DNA أنتجت بلازميد يحمل الجين المعوِّض، ولكنه يُفقد أثناء عملية الانقسام في بعض الخلايا (أي أنه غير ثابت). من خلال استخلاص كامل الـــDNA من خلايا المستعمرات المقطعة (غير الثابتة) من الـــ*A. nidulans* ونقله إلى الـــ*E. coli* يمكن عزل البلازميد الحامل للـــDNA الفطري الذي تَمَكَّن من تكملة الطفرة الأساسية في *A. nidulans*. من حسنات هذه الطريقة هي أنها سريعة ولا تتطلب تحضير مكتبة جينية (من الـــDNA الكامل) لكل واحد من جينات الفطر.

3.3.5 عزل الجين بتقنية الـــ PCR — Gene isolation by PCR

يُعتمد حالياً تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction أو PCR) كتقنية أساسية وواسعة الانتشار لانتساخ جين معين وعزله (الشكل 8.4). كي تنجح هذه التقنية في انتساخ جين معين، لا بد من توفر معلومات عن بروتين ذي وظيفة مشابهة عند كائن آخر، وعن تسلسل DNA الجين المشفر له في قواعد المعلومات عبر الإنترنت. لحسن الحظ، تتوفر معلومات واسعة عن تسلسل الجينوم

عند العديد من الأصناف الفطرية، ولا تزال المعلومات تزداد. كما يتوفر غالباً مع التسلسل الجينومي حواشي تبين كل المورثات المعروفة وتلك المفترضة مع وظائفها. من خلال مقارنة تسلسل تلك المورثات أو البروتينات مع بعضها البعض نحصل على تسلسلات محفوظة جداً (Highly conserved) يمكن استعمالها لتصميم بادئات لتفاعل الـــPCR.

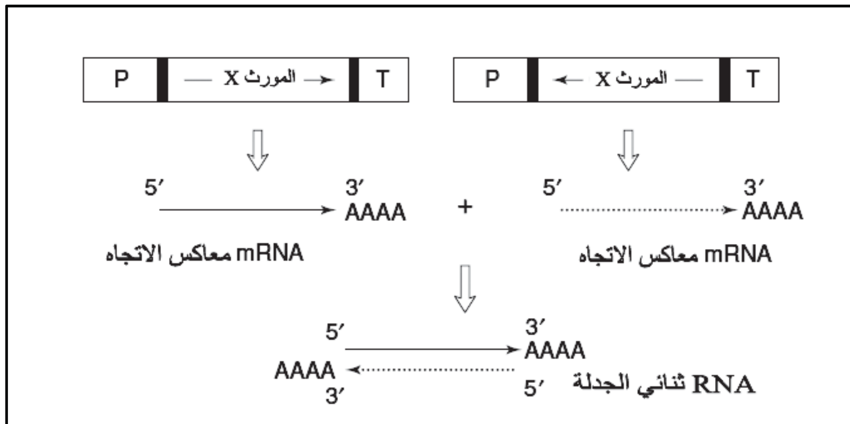


الشكل 10.5: "بادئ تعشيش". فائض من مزيج بادئات تفاعل 1 و 2 صُمِّمت لتلتحم مع منطقة محفوظة (conserved) في الجين المستهدف تستخدم في الـــPCR الأولي. مزيج من بادئات تفاعل 3 و 4 صُمِّمت لتلتحم مع مناطق محفوظة أخرى تقع داخل المناطق الأولى، وتُستعمل في الـــPCR الثانية باستعمال منتج الـــPCR الأولي كقالب (template). وبذلك يتم إغناء التفاعل بتسلسل الجين المستهدف وتضخيمه بشكل فعال.

وبما أن الشفرة الوراثية (Genetic code) تحتوي على شفرات مكررة (Redundant)، أي أن الحمض الأميني الواحد يمكن أن يُشفَّر بأكثر من كودون (Codon)، فإن بادئات التفاعل (المُصمّمة بناء على تسلسل الحمض الأميني في البروتين) هي مزيج من جزيئات DNA ذات احتمالات تسلسل متعددة، ولكنها كلها تعطي نفس تسلسل الحمض الأميني. في الحالة المثالية يكون تسلسل الأحماض الأمينية في مناطق المحفوظة مشفراً بأقل عدد من الكودون لتفادي تصميم عدد كبير من بادئات التفاعل ولتفادي إنتاج جزيئات غير مرغوب فيها في تفاعل الــPCR. وإذا استحال حدوث ما تقدم، فهناك إستراتيجيات أخرى لتجاوز تلك المشاكل والعقبات، منها استعمال بادئات تفاعل للتعشيش (Nested primers). يُستعمل في هذه التقنية زوجان اثنان من بادئات التفاعل (بعد تفاعل الــPCR الأول الذي يستعمل الزوجين الأولين) في التفاعل الثاني للــPCR، يتم تصميمهما بناء على مناطق محفوظة تقع ضمن المنطقة الأولى (الشكل 10.5). يَستعمل التفاعل الثاني القالب (Template) من التفاعل الأول، ويُنتِج بعد التضخيم جزيئات متفاوتة الطول تظهر بشكل لطخه (Smear) على هلام الأكار (Agar) بعد الرحلان الكهربائي. تختلف درجة الحرارة التي يلتحم عليها بادئي التفاعل مع القالب (annealing Temperature to template) بحسب تسلسل القواعد في الــDNA، لذلك هناك مجال ضيق تكون فيه الحرارة مناسبة للالتحام عند استعمال مزيج من بادئات التفاعل ذات تسلسلات مختلفة. من الناحية العملية يجب تجريب درجات حرارة مختلفة للالتحام (في التفاعل الأول والثاني) وكذلك تجريب محاليل ذات محتوى وتركيز مختلف، وذلك من أجل الحصول على DNA مُضخَّم ذي خصوصية عالية، لا ينتج إلا من بادئات التفاعل الخاصة بالمورث المستهدف. وللتأكد من مُنتَج التضخيم يُنصح انتساخ قطع الــDNA وتحديد تسلسلها، ثم استخدامها كمسبار لانتقاء وعزل الجين الكامل من مكتبة جينية.

إن نقطة الضعف في كل طرق عزل الجين التي لا تعتمد على التتام هي غياب المعلومات عن وظيفة الجين وفعاليته. إن مقارنة تسلسل هذا الجين مع

تسلسلات جينات أخرى في أصناف حية أخرى نادراً ما تعُطي إجابة نهائية بالنسبة إلى وظيفة المورث، وخاصة إذا كان الكائن الحي غير مدروس بشكل وافٍ. من ضمن دراسة وظيفة الجين يمكن إجراء محو أو تعطيل لرؤية مدى أهميته لنمو الكائن الحي. أما إذا لم نحصل على تغيرات شكلية (Phenotype) واضحة من هذه الطريقة، فيمكن استعمال مبدأ التتام الجيني (Gene complementation). من الإستراتيجيات الإضافية المستعملة، خاصة عندما يكون الجين ضرورياً للنمو، تلك التي تقوم على مبدأ خفض كمية البروتين الناتج في الخلية. تعتمد هذه الطريقة المسماة "المصل المضاد" (Antisense) علىRNA تم نسخه من المورث بالاتجاه المعاكس وهو مُكمِّل بتسلسله (Complementary) للـــRNA الرسول الاعتيادي (Sense) فيقوم بإعاقة إنتاج البروتين من قبل الخلية (الشكل 11.5). أصبحت هذه الاستراتيجية معتمدة بشكل واسع لتقييم وظيفة جين محدد في كلٍّ من الخمائر والفطريات الخيطية، ذلك بالرغم من فشلها في بعض الأحيان.



الشكل 11.5: ميكانيكية لتثبيط إنتاج البروتين باستخدام الــRNA معكوس الاتجاه (antisense). شكل المستطيل المفتوح هو تسلسل الجين المطلوب X والمنسوخ بالاتجاهين تحت ضبط المحرك P وتسلسل توقف النسخ T . بناء على اتجاه الجين أمام المحرك، فإن عملية النسخ تعطي نوعين من الــRNA أحدهما باتجاه، والثاني بالاتجاه المعاكس، والاثنان مزودان بذيل متعدد الأدينوزين (Poly A tail) على الطرف. تلتحم هاتان الجدلتان من الــRNA المكملتين لبعضهما البعض لتكون RNA ثنائي الجدلة. إن تكوين هذه الجزيئات من الــRNA في النواة يُضعف إنتاج الــRNA الناضج والجاهز للترجمة في السيتوبلازم.

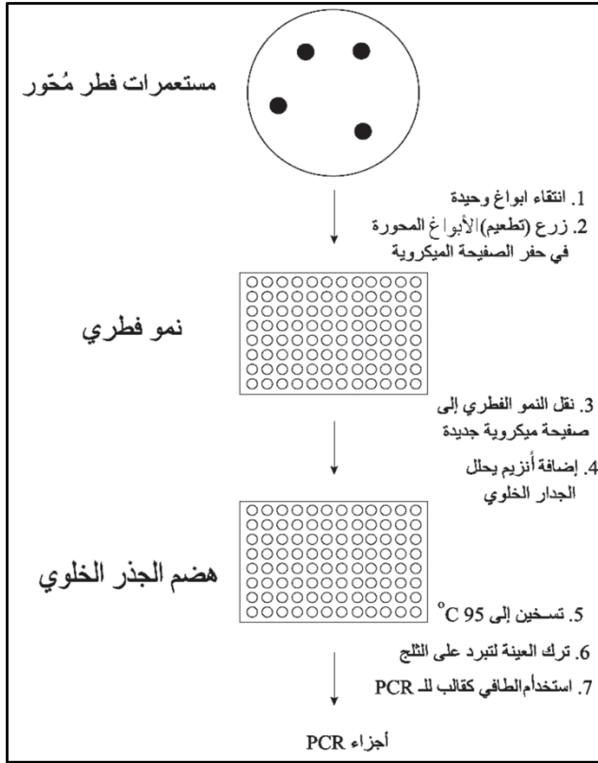
4.3.5 تفاعل الـــPCR والفطريات PCR and fungi reaction

بالإضافة إلى استعمال الـــPCR في عزل الجينات فهي تُستخدم أيضاً لمسح وفحص نتيجة التحوير الجيني في منظومات مختلفة. في بعض الفطريات الخيطية، يشكل وجود الجدار الخلوي عائقاً كبيراً أمام الحصول على DNA بكمية ونقاوة مناسبتين لعملية مسح شامل واسع بتنقية الـــPCR على نطاق واسع. ثم تم تطوير طريقة تنمية مستعمرات الفطر في وسط سائل في أطباق صغيرة الحجم ملتصقة بشكل صفيحة سمّيت صفيحة مايكروتيتر (Microtiter plates)، حيث يزال الجدار الخلوي بتحليل أنزيمي لنحصل على البروتوبلاست. تكفي درجة الحرارة العالية أثناء مرحلة المسخ (Denaturation) في تفاعل الـــPCR لتحليل البروتوبلاست والحصول على DNA يُستخدم للمسح والبحث (في كل الأطباق الصغيرة على الصفيحة) عن قطعة DNA المطلوبة التي تفيد عن حصول التحوير المنشود (الشكل 12.5). هناك بروتوكول آخر يُستخدم مع مايسيليوم والأبواغ أو الخلايا الكاملة يشتمل على خطوة أولية قصيرة على حرارة عالية تضمن انفجار الخلية وتوفر الـــDNA لتفاعل الـــPCR، وهي طريقة ناجحه مع أصناف فطريات عديدة.

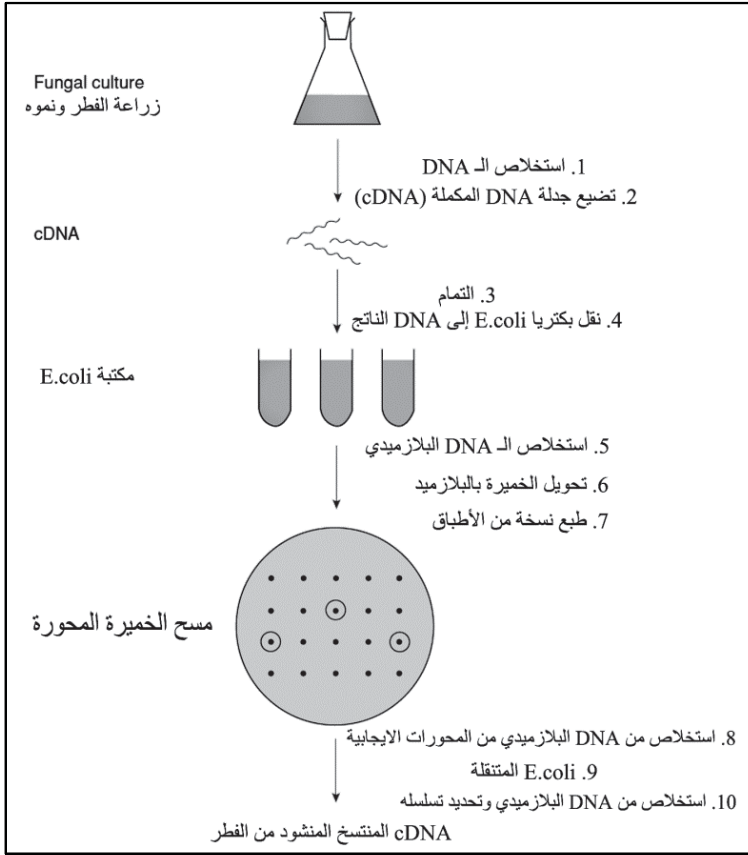
5.3.5 مسبارات من جينات مختلفة الأصل Heterologous gene probes

هناك استراتيجية ثالثة لانتساخ وعزل جين معين، تستخدم فيها قطع DNA موسومة بمواد مشعة تستعمل كمسبار (Probes)، ومأخوذة من جين (لنفس البروتين) من صنف كائن حي مختلف عن ذلك الذي يتم عزل المورث منه. يمكن تسمية هذا النوع من المسبار بالمسبار الجيني الغريب أو مختلف الأصل (Heterologous gene probes). يمكن إجراء تجربة أولية لتحديد ظروف التهجين المثالية (بين مسبار وDNA مختلفي الأصل) والكشف عن فعالية الطريقة من خلال تقنية وصمة ساوثرن (Southern blotting)، حيث يتم نقل الـــDNA ذي الجدلة الواحدة من هلام الأكار (وبعد الرحلان الكهربائي) إلى غشاء نايلون حيث تتم عملية التهجين. قبل ذلك يكون الـــDNA قد تم فرزه وتم ترتيب الجزئيات حسب أحجامها. في الغالب هناك درجة من الاختلاف بين المسبار والـــDNA المستهدف نظراً إلى أصليهما

المختلفين، لذلك فإن اختيار درجة الحرارة التي يتم عليها التهجين (Hybridization temperature) هو عامل ذو أهمية عالية، ويجب أن يتَّسم بالدقة. كما يمكن رفع مستوى خصوصية التحام المسبار والــDNA من خلال تغيير تركيز الأملاح في المحلول المستعمل لغسل الغشاء بعد التهجين (الغسل المزيل للمسبار الذي التصق عشوائياً). بعد تحديد ظروف التهجين المثالية يمكن استخدام هذه الطريقة لمسح المكتبة الجينية لهذا الكائن وعزل الجين المطلوب.



الشكل 12.5: مسح لإيجاد الخلايا المحورة من الفطريات باستخدام الــ PCR. يتم زرع أبواغ (منتقاة من مستعمرات فطر محورة على طبق من أكار يحتوي على الوسط الغذائي المناسب) في صفائح مايكروتيتر (Microtiter plates) في وسط غذائي. بعد فترة نمو تتراوح بين 16 و 24 ساعة، ينقل جزء من خلايا المايسيليوم إلى طبق آخر يحتوي على محلول (buffer) من سيترايت وكلور البوتاسيوم (KCl/citrate) وكذلك أنزيم يحلل الجدار الخلوي لبعض الخلايا الفطرية ويحولها إلى بروتوبلاست. وبعد ساعة من الحضانة بدرجة حرارة 37ºC، يؤخذ من الجزء الطافي (supernatant) بين 5 و 10 مكروليتر ليكون مصدر الــDNA القالب (template)، وذلك بعد كسر البروتوبلاست خلال الحرارة العالية في تفاعل الــPCR.



الشكل 13.5 : انتساخ تعبيري (Expression cloning). يتم تحضير مجموعة الــDNA المكمَّل (cDNA) المأخوذ من خلايا مزروعة تفرز مجموعة بروتينات مُفرزة، ثم يتم دمجها في ناقل تعبير للخميرة ويقدر على التضاعف في *E. coli*. يتم تجميع الــDNA من عدد من البكتيريا المحورة ثم تُستعمل لتحويل خلايا خميرة S. cerevisiae . ثم يُصار إلى مسح وانتقاء الخمائر المحورة من خلال تفاعل أنزيمي مناسب.

6.3.5 طرق عزل الجين بناء على قواعد المعلومات والارتباط الجيني

Database and linkage-Based methods for gene isolation

وأخيراً هناك استراتيجيتان أخريان يمكن استعمالهما لانتساخ وعزل جين. الأولى، تسمى "سنتني" (Synteny) التي تَعتمد على مبدأ يعتبر أنه بالرغم من وجود اختلاف كبير بين تسلسلات الــDNA في جينات أصناف مختلفة، إلا أن الارتباط الجيني (Gene linkage) يبقى (بدون اختلاف). لذلك إذا كان الجين A والجين B

متجاورين على نفس الكروموسوم في كائن X، وإذا انطبق هذا الوضع في الفطريات، عند انتساخ وعزل الجين B يمكن أن يُنتسخ الجين A في نفس الوقت لأنه قريب منه. ومن أهم متطلبات هذه الطريقة هي خريطة جينية مفصلة للكائن X. هناك عدد من خرائط الجينوم لكائنات حية قد تم اكتشافها، وهناك أخرى في طور الاكتشاف، وبالتالي فالطريق مفتوح أمام استخدام هذه المقاربة (الجدول 1.5).

هناك مقاربة بديلة لهذا المبدأ عبر استخدام مكتبات الـــDNA المتمم (cDNA) الجزئية والتي تُحضَّر من RNA الفطر، وباستخدام أدوات جاهزة ومتوفرة تجارياً لتصنيع الـــcDNA. تسمى مكتبة الـــcDNA الجزئي إشارة السلاسل المُعبَّرة Expressed Sequence tag أو EST لانها تشتمل على أطراف التسلسلات المنسوخة. عند اتحادها مع السَّلسَلة المُؤتمتة (Automated sequencing) تُعطي هذه المقاربة معلومات يمكن استعمالها مقارنة بقواعد المعلومات للكشف عن هوية الجينات المُعبَّر عنها.

7.3.5 الكلونة أو الاستنسال التعبيري Expression cloning

في نمط حياة بعض الفطريات يتم إفراز تركيز عال من البروتينات، عدد كبير منها ذو أهمية صناعية في مجالات شتى. هناك طريقة فعالة وسريعة تم تطويرها مؤخراً تُعرف بالنسخ التعبيري وتسمح بانتساخ وعزل جينات مشفرة لبروتينات (أو أنزيمات) مفرزة خارج الخلية (الشكل 13.5). وفي هذه الطريقة يتم تنمية الفطر في ظروف تسمح بتعبير الجين المشفر للبروتين الإفرازي. ثم تُستخلص مجموعة الـــmRNA الرسول وتستعمل لتحضير الـــcDNA بالنسخ العكسي، ثم تُحضر مكتبة cDNA في داخل الـــ E. coli. بعد ذلك يُستعمل الـــDNA من المكتبة لتحويل S. cerevisiae. بعد تنمية الخمائر المحورة يتم تحليل الوسط الغذائي للكشف عن وجود الأنزيم المطلوب، وبالتالي المورث المشفر له في الخلية المحورة. هناك أنواع أخرى من الخمائر يمكن استعمالها كمضيف في عملية التحويل وهي *Yarrowia lipolytica*، و *K. lactis*، و *Pichia angusta* (اسمها السابق *Hansenula polymerpha*) و *S. pombe*. لقد برهنت هذه الطريقة كفاءتها من خلال نجاح انتساخ ما لا يقل عن 150 أنزيماً من فطريات مختلفة، منها أرابيناز

Arabinananses، إندوكلوكانيز Endoglucanases، كالاكتانيز Galactanases، مانيز Mannases، بكتينيز Pectinases، بروتييز Proteases وغيرها كثير. تعتمد هذه الطريقة على بناء cDNA مكتمل كي نضمن وجود الجين كله مع إشارة إفراز هذا البروتينوالتي يُفترض أن تكون فعالة في خلية الخميرة المضيفة. كما لا بد من أن تكون الخميرة على إنتاج البروتين بشكله الناشط وأن تكون طريقة تحليله سهلة.

4.5 بنية الجين، تنظيمه وعملية التعبير
Organisation and expression, gene structure

نلاحظ بشكل عام أن إشارات النسخ في جينات الكائنات الراقية هي أكثر تعقيدا منها في الكائنات البسيطة كالبكتيريا. نلاحظ أيضاً أن هيكلية الجين عند الفطريات تُظهر تشابهاً في ميزات عديدة بين أنواع مختلفة من الفطر. يمكن تصنيف ثلاث وحدات نظامية أساسية في جينات الفطر يمكن تقسيمها إلى (أ) إشارات ضبط بدء النسخ أو عدمه ضمن المحرك (Promoter) ، (ب) وإشارات ضبط إنهاء عملية النسخ (Terminator)، (ج) وإشارات ضبط عملية القطع والوصل لإزالة الدخلونات (Introns) من الـــRNA الرسول (mRNA).

على خلاف مورثات البكتيريا، فإن جين الفطر يمتلك محركاً قد يمتد مسافة طويلة (أكثر من واحد kb) في ما قبل (Upstream) موقع بدء النسخ (Transcriptional start point أو tsp).

خلال تجارب الانتساخ الأولية على الـــS. cerevisiae كانت الفكرة المعتمدة تقول بضرورة استعمال المحرك الطبيعي (غير المُحوَّر) من الـــ S. cerevisiae للتمكن من الحصول على تعبير الجين الغريب، ولكن التجارب التي تلت أظهرت أن محرّكاً من خمائر أخرى كالـــK. lactis، يمكن أن يعمل في الـــ*S. cerevisiae* أيضاً. وجد أن المحركات في الفطريات الخيطية تعمل بشكل جيد ضمن النوع (Genus) الواحد، ولكن لا يمكن توقع مدى فعاليتها في أصناف بعيدة وأقل تشابهاً.

يمكن تقسيم المحركات إلى نوعين، الأول يعمل باستمرار ويسمى المحرك الدؤوب (Constitutive) بينما يعمل الثاني بالتحفيز (Inducible) والتثبيط، مما يجعله يبدأ بالعمل أو يتوقف حسب الحاجة. وفي هذين النوعين من المحركات يمكن أن يتواجد موقع tsp واحد أو أكثر، وهو من ضمن المحرك الذي يحتوي أيضاً على تسلسلات هي مواقع ارتباط بروتينات الضبط والتنظيم (Regulatory protein). ومن تلك التسلسلات هناك موقع تكثر فيه القواعد T و A يسمى صندوق تاتا أو TATA box، وهو مسؤول عن تحديد نقطة بدء النسخ tsp ويحافظ على مستوى أساسي (أدنى) من نسخ الجين. كمثال على دور صندوق تاتا نذكر محرك الجين HIS4 (يُشفر أنزيم إزالة الهيدروجين من هيستيدينول (Histidinol dehydrogenase) المسؤول عن تصنيع الهيستيدين) الموجود في S. cerevisiae الذي يبدأ النسخ بوجود صندوق تاتا أو عدمه، ولكن نشاط النسخ العالي لا يحصل إلا بوجود صندوق تاتا. ولكن هذا لا ينفي وجود محركات قوية في الخمائر لا تحتوي على صندوق تاتا. بما أن عدداً كبيراً من محركات الفطريات الخيطية والخمائر لا تحتوي صندوق تاتا، فلا بد من تسلسل آخر يقوم بنفس دور صندوق تاتا، فهناك مثلاً تسلسل غني بالبيريميدين (Pyrimidine)، يسمى صندوق CT (CT-box). يمكن وصف تلك التسلسلات بأنها قلب المحرك (Core promoter). هناك تسلسل ثالث مهم أيضاً يُعتبر من ضمن قلب المحرك وهو CCAAT. ولكن معظم (حوالى 95%) المحركات في S. cerevisiae لا يبدو أنها تقتضي وجود هذا الصندوق (CCAAT-box) كي تعمل. هذا وقد تبين أن صندوق CCAAT يعمل في A. nidulans. هنا لا بد من التأكيد أن معظم المحركات الفطرية التي تم عزلها وانتساخها لم تتم دراسة وظيفية للتسلسلات المختلفة فيها، لذلك لا زال الغموض يكتنفها.

في حالة المحركات الدؤوبة (Constitutive) يُحدد المستوى الأساسي من النسخ من خلال ارتباط مجمع بروتيني، أو المجمع النسخي (Transcriptional complex)، من ضمنه الــRNA بوليميرايز (اسمها العام Upstream factors

أو General factors)، مع تسلسل قلب المحرك. أما المحركات المُحفَّزَة فهي على عكس ذلك لأن مستوى النسخ يتغير بعشرات الأضعاف. أما العامل المنظم المسؤول فإنه يقع في موضع أعلى (قبل) تسلسل قلب المحرك، ويسمى ذلك التسلسل المُحفز في أعلى الموقع Upstream Activation Sequence أو UAS وذلك المثبط Upstrcam Repression Sequence أو URS. ترتبط بهذه التسلسلات UAS/URS بروتينات ضبط وتنظيم (Regulatory proteins) تقوم بشكل مباشر أو غير مباشر بإسناد المجمع البروتيني (المجمع النسخي Transcriptional complex) المرتبط مع قلب المحرك أو تُزعزعه. ينتج من ذلك ارتفاع أو انخفاض مستوى بدء النسخ.

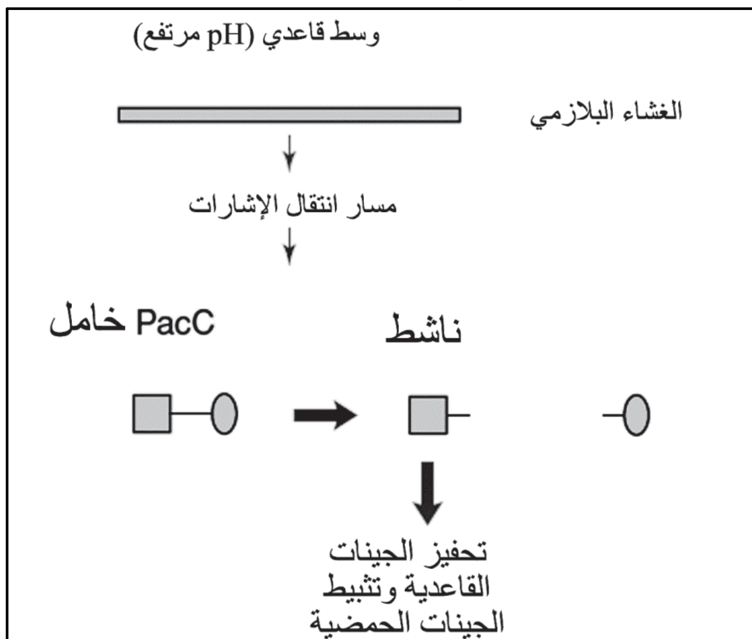
إن تسلسلات الضبط والتنظيم التي تسيطر وتتحكم بتعبير المحركات المُحفَّزة (Inducible) تتواجد في محركات جينات متعددة ومشفرة لبروتينات ذات وظائف مختلفة، ولكن التحكم بها كلها يتم بواسطة بروتين مُنظِّم واحد. ففي شبكة كهذه من الجينات ذات الضبط المشترك، فإن مجموعة من المورثات تتجاوب مع أي عامل يؤثر في فسلجة الخلية كمستوى الحموضة pH، أو نوع مصدر الكربون أو النيتروجين. على سبيل المثال، في الفطر الخيطي *A. nidulans* هناك بروتين مسمى PacC يرتبط بتسلسل معين في محركات الجينات المشفرة لبروتينات تتجاوب مع الحموضة (pH-responsive) (الشكل 14.5). فعندما يكون الوسط قاعدياً يتم تنشيط الــPacC بواسطة أنزيمات تحلل البروتين (protease)، ثم يقوم الــPacC بتنشيط تعبير عدد من الجينات الضرورية في الوسط القاعدي مثل (Isopenicillin N Synthase) ويُثبط تعبير الجينات التي تعمل في الظروف الحمضية مثل Acid phosphatases. هناك مثال آخر مشابه في *S. cerevisiae* وفي بعض أنواع *Kluyveromyces spp.* حيث نجد بروتين Mig1p الذي يرتبط بتسلسل غني بالــGC يدعى (GC box) يقع في محركات الكثير من المورثات المسؤولة عن استعمال مصادر الكربون، ويتم هذا الارتباط بطريقة تعتمد على الكلوكوز. يتحد الــMig1p مع بروتينات أخرى ليُثبط نسخ الجينات المسؤولة عن

هدم مصادر الكربون ذات الكفاءة الأقل في إنتاج الطاقة (مقارنة بالكلوكوز ونظائره من المركبات السكرية الأخرى)، تسمى هذه العملية "التثبيط بمركبات هدم الكربون" (Carbon catabolite repression). في الفطريات الخيطية *A. nidulans* و *Trichoderma reesei* هناك بروتينات CreA و Cre-1 (بالتتابع) التي ترتبط بصندوق GC الواقع في محركات جينات مسؤولة عن هدم الكربون. هناك مثال آخر على شبكة من المورثات المسؤولة عن هدم مصادر النيتروجين، والتي يضبط تعبيرها بروتين مُنظِّم يدعى AreA في الفطر *A. nidulans* و Nit2 في الفطر *N. crassa*. فعند توفر مصدر نيتروجين بسيط التركيب كالأمونيوم والغلوتامين (Amonium and glutamine) فإن الجينات المسؤولة عن استهلاك مصادر النيتروجين المعقده تتوقف عن العمل.

بالإضافة إلى عملية الضبط الشاملة لشبكة من الجينات ذات الخصوصية الواسعة ، هناك منظومات تحكم متخصصة بمسار أيضي محدد. إن منظومة التحكم الإيجابي Af1R تُنظم التعبير الجيني لما لا يقل عن 25 مورثاً مختلفاً مسؤولاً عن مسار تركيب المادة الفطرية السامة المسماة أفلاتوكسين (Aflatoxin). كل هذه الجينات تحتوي على تسلسل خاص يسمح بارتباط بروتين Af1R لتنشيط عملية النسخ. لقد تبين في هذه الحالة أن الجينات ذات الضبط المشترك المنسق متجمعة في منطقة صغيرة على أحد الكروموسومات. ولكن في حالات كثيرة ليست هناك ضرورة أن تكون الجينات المضبوطة بعملية واحدة، سواء كانت مسؤولة عن مسار أيض واحد أو لا، ليست هناك ضرورة بأن تكون متقاربة فيزيائيًا، ولا حتى على نفس الكروموسوم.

إن معظم المعلومات التي تخص توقف النسخ في الفطريات أتت من دراسات على S. cerevisiae. ويرتبط توقف النسخ بشكل قوي مع عملية الأدنلة المتعددة (Polyadenylation)، وهي إضافة عدد كبير من نيوكليوتيد الأدنين تصبح ذيلاً للــRNA الرسول (Poly A mRNA tail) والذي يقوم بوظيفة أساسية هي تثبيت الــmRNA (Stabilization). لقد لوحظ أن طفرات معينة في خميرة *S. cerevisiae* تؤدي إلى نقص في نسبة تكسير ذيل الــPolyA، وبالتالي

إلى ازدياد ثبات الـــRNA الرسول. تفتقر معظم جينات الخمائر إلى التسلسل AATAAA المرتبط بعملية الأدنلة المتعددة في الخلايا الحقيقية النوى من الكائنات الراقية. إلا أنه تم اكتشاف تسلسلات أخرى مرتبطة بعمليات إيقاف أو إنهاء النسخ منها أولاً تسلسل TTTTTAT الذي يعمل في اتجاه واحد فقط، وثانياً تسلسل ذو مكونات ثلاثة ويعمل بالاتجاهين هو (. . (T-rich) . . TAG TTT . . (AT-rich). TA(T)GT) (تُقرأ من اليسار إلى اليمين). يبدو أن تسلسلات متنوعة تقوم بإيقاف النسخ في *S.cerevisiae*.



الشكل 14.5 : عملية تنظيم النسخ بواسطة درجة الحموضة (pH) في فطريات خيطية. يتم تحسس درجة الحموضة في خارج الخلية، ويؤدي ذلك إلى تغيير التعبير الجيني. ففي الفطريات، يقوم عامل النسخ PacC بضبط التعبير للجين المشفر للبروتين الضروري لحياة الخلية في ظروف قاعدية. تتحسس الخلية ارتفاع الـــpH وترسل إشارات داخلية تؤدي إلى بتر قطعة من جزيء الـــPacC (الخامل) فيتحول إلى جزيء ناشط فعال يُحفِّز نسخ جينات تنشط في وسط قاعدي (base genes) مثل الجين الذي يُنتج أنزيماً قلوياً لتحليل الفوسفات أو alkaline phosphatase. كما يقوم جزيء الـــPacC الناشط بتثبيط نسخ الجينات التي تعمل في وسط حمضي (acid genes). يعمل جزيء PacC المبتور من خلال ارتباطه بالمحرك، مع التسلسل 5'GCCARG3' حيث ترمز R إلى G أو A.

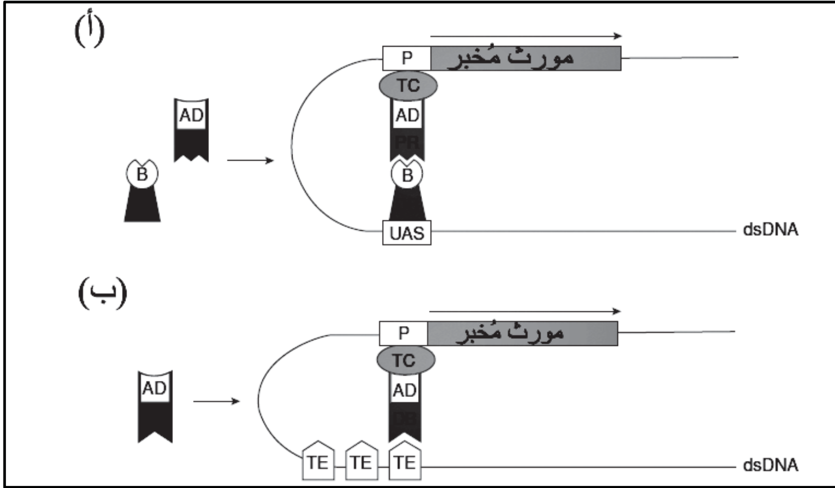
كما ذُكر سابقاً فإن جينات الكائنات الراقية تختلف عن جينات البكتيريا إذ إنها تحتوي على دخلونات (Introns) غير مشفَّرة التي لا بد من قطعها وإزالتها من الـــRNA الرسول قبل الترجمة إلى بروتين. تسمى عملية القطع والوصل (splicing). كما تختلف خميرة *S.cerevisiae* عن جينات الفطريات الخيطية لجهة وجود دخلونات ونوعها وطبيعتها. فإن معظم جينات خميرة *S.cerevisiae* لا تحتوي دخلونات، بينما يحتوي عدد قليل من المورثات على دخلون واحد. أما مورثات الفطريات الخيطية مثل *S. pombe* فإنها تحتوي بضع دخلونات يتراوح طولها بين 50 إلى 100 bp. بما أن إدخال جينات من الفطريات إلى S.cerevisiae يؤدي إلى نتائج غير صحيحة في عمليات الوصل splicing فإن ذلك يدل على ميكانيكية وصل Splicing مختلفة تماماً بين أصناف الفطر، بالرغم من أن جين amdS من .A nidulans الذي يحتوي على ثلاثة دخلونات يتم القطع والوصل بشكل صحيح في عدد من سلالات الفطر الخيطي. يلاحظ في الغالب أن مواقع الدخلونات لا تتغير في الجين الواحد بين أنواع كثيرة من الفطر الخيطي، ولكن تسلسلاتها تختلف، وأن الدخلون لا يقع بالضرورة ضمن المنطقة المشفِّرة من الجين، إذ إنه يقع في بعض الأحيان بين موقع بدء النسخ (tsp) وموقع بداية الترجمة للـــRNA الرسول.

5.5 منهجيات أخرى Other methodologies

1.5.5 منظومة التهجين الثنائي في الخمائر Yeast two-hybrid system

تم تطوير هذا الاختبار في الـــ*S. cerevisiae* للكشف عمّا إذا كانت بروتينات محددة تتفاعل وتلتصق ببعضها البعض داخل الخلية (الشكل 15.5 أ). يمكن استعمال هذه الطريقة لدراسة بروتينين مورثاتهما منتسخة ومعزولة، كما يمكن استعمالها في نطاق أهم، ألا وهو تشخيص جينات من خلال مكتبة للـــcDNA حيث نبحث عن أي تفاعل أو ارتباط بين بروتين يسمى الطعم (Bait) والبروتينات الناتجة من مكتبة الـــcDNA. يعتمد هذا الاختبار على كون بروتينات التنظيم (Regulatory protein) أو عوامل النسخ (Transcription factor) تتألف من وحدة بروتينية ذات مجالين (Domain)، أحدهما يرتبط بالـــDNA

والآخر يقوم بالتأثير في بدء النسخ. في معظم المنظومات من هذا النوع يُعتمد على بروتين مُنظِّم مُحفِّز للنسخ يسمى Gal4p الذي ينظم استهلاك الكالاكتوز في خميرة *S.cerevisiae*. أما بشأن الجين المُخبر النمطي الذي نقوم بقياس مقداره خلال التجربة فهو جين LacZ المُشفِّر لأنزيم β-كلاكتوسايديز الذي يتميز بسهولة الكشف عن نشاطه. فعندما يحصل الارتباط الصحيح بين البروتينات قيد الدرس سوف يؤدي ذلك إلى تنشيط المحرك وإنتاج هذا الأنزيم، بينما الفشل بالارتباط (في الشاهد Control) يؤدي إلى عدم انتاج الأنزيم. وهذه منظومة ناجحة لدراسة الترابط والتداخل الوظيفي بين بروتينات من أي كائن حي، ولكن لدى الحصول على نتيجة إيجابية بين بروتينين بهذه الطريقة لا بد من التحقق من صحة النتيجة عبر تحاليل كيميائية حيوية. أصبح هذا الاختبار الآن متوفراً تجارياً مع كل الأدوات والمواد المطلوبه جاهزه للاختبار (Commercial kit).



الشكل 15.5 : (أ) نظام التهجين الثنائي في الخمائر مبني على عامل النسخ GAL4p (Gal4p transcription factor)، الذي يحتوي على منطقة ترتبط بالــDNA يُرمز إليها بــDB ومنطقة تحفيز النسخ يُرمز إليها بــAD. يقوم عامل النسخ GAL4p بتنشيط عملية استهلاك الكالاكتوز في خميرة *S.cerevisiae*. يرمز P إلى محرك من الخميرة مُنشَّط بواسطة GAL4p، و TC إلى مركب النسخ (transcription complex) الذي يحتوي على أنزيم بلمرة الــRNA. ويرمز DB إلى منطقة الارتباط بالــDNA في GAL4p وقد تم دمج DB مع B التي ترمز إلى بروتين معلوم الوظيفة ويلعب دور الطعم (bait). يرمز PR إلى بروتين فريسة (prey) قيد الدراسه أو cDNA

من مكتبة، تم دمج الفريسة مع الــAD من GAL4p، أي منطقة تنشيط النسخ. يرمز UAS إلى (upstream activating sequence) إلى تسلسل ضروري لتفعيل النسخ يقع قبل بدء المورث، يرمز dsDNA إلى DNA ثنائي الجدلة. يتم تنشيط تعبير الجين المُخبر LacZ (الذي يحمل شفرة أنزيم β-كلاكتوزيديز (β-galactosidase)) إذا اجتمع DB و AD من خلال ارتباط بروتيني الطعم والفريسة مع بعضهما البعض. (ب) نظام التهجين الأحادي في الخمائر زالمبني أيضاً على عامل النسخ GAL4p. يرمز TE إلى (target element) إلى تسلسل الــDNA المستهدف الذي يُصمم عادة من ثلاث نُسخ مكررة. يرمز AD-DB إلى منطقة التنشيط في GAL4p مدمجة مع بروتين يرتبط بالــDNA قيد الدراسة أو مدمجة مع منتجات مكتبة cDNA. باقي الرموز هي نفسها في القسم السابق من هذا الشكل. يتم تنشيط تعبير الجين المُخبر LacZ إذا ارتبط DB (المفترض) بــTE.

2.5.5 منظومة التهجين المنفرد للخميرة Yeast one-hybrid system

تم تطوير هذا الاختبار بناء على الاختبار السابق (التهجين الثنائي) ويهدف إلى تحديد إذا ما كان جين يحمل شفرة لبروتين قادر على التعرف والارتباط بتسلسل معين في الــDNA، مثل عوامل النسخ (Transcription factor) التي تُنظِّم التعبير الجيني، وكذلك البروتين الذي يلتحم مع تسلسلات أخرى ضمن الــDNA مثل موقع بدء التضاعف (الشكل 15.5 ب). لدى اكتشاف منتسخ (Clone) إيجابي، أي أن الجين المخبر بدأ بالتعبير، يتم دراسة وتحليل التسلسل المسبب لهذه النتيجة ومقارنته ببيانات قاعدة المعلومات الإلكترونيه للــDNA للبحث عن تسلسل معروف مشابه له وقادر على الالتحام بالــDNA، وذلك بهدف كشف هوية ووظيفة البروتين قيد الدرس، ثم يتم التحقق من النتيجة من خلال اختبارات ارتباط البروتين مع الــDNA (Protein-DNA binding assays).

3.5.5 كوزميد وكروموسومات اصطناعية

Cosmids and artificial chromosomes

مع تطوير نواقل ذات قدرة على نقل قطع كبيرة من DNA الكروموسوم، التي قد يصل طولها إلى 50 kb. أصبح من الممكن انتساخ مجموعة مورثات مسؤولة عن مسارات أيض كاملة في الفطريات (شريطة أن تكون مجتمعة

في موقع واحد على نفس قطعة الــDNA)، كما يمكن أن تنتقل إلى خلايا كائن آخر. لقد تم تصميم الكوزميد كي يتم تضاعفه في بكتيريا E. coli وفي الفطريات الخيطية. وعلى غرار النواقل الأخرى، يمكن للكوزميد أن يندمج مع كروموسوم الخلية الفطرية المضيفة أو أن يتضاعف بشكل مستقل خارج الكروموسوم. لقد استُعمِل الكوزميد لانتساخ قطعتين من الــDNA متداخلتين تحملان كامل مورثات مسار إنتاج Aflatoxin/ Sterigmatocystin ، الذي يتألف من 25 مورثاً مُنضبطاً بشكل متوازٍ مشترك، وذلك من *Aspergillus spp.* في مثال آخر تم بفضل الكوزميد انتساخ ثلاثة جينات أساسية لعملية تصنيع البنيسيلين من سلالة Penicillium chrysogenum ثم تم نقلها والتحامها بالكروموسوم في فطر Aspergillus niger وكذلك N. crassa، حيث أصبحا قادرين على إنتاج البنيسيلين.

يتوفر حالياً كروموسوم الخميرة الاصطناعي (YAC أو Yeast artificial chromosomes) ويساعد بنقل وانتساخ قطع DNA كبيرة. الــYAC عبارة عن قطعة DNA خيطية (Linear) الشكل يصل طولها إلى 620 kb، تتصرف وكأنها كروموسوم صغير. ولكن مشكلة الثبات مع الــYACs أدت إلى تطوير بديل له يدعى BAC أي (Bacterial artificial chromosome)، ولكن الــYACs لا زال يُستعمل في تطبيقات عدة. فقد تم استعمالها لدراسة التعبير لجينات غريبة في خلايا ثدييات وأيضاً في حيوانات كاملة. ولقد استُعمل YAC لدراسة التلف الكروموسومي في خلايا راقية، وكذلك لوضع خريطة الــESTs في الجينوم، وأيضاً في مشاريع انتساخ قطع كبيرة من الجينوم خلال عملية السَّلسلة (Sequencing) للجينوم.

4.5.5 تقانات الجينوم وما بعد الجينوم

Genomic and post-genomic technologies

لقد أدت القدرة على دراسة تسلسلات الجينوم الكامل لكائن حي إلى تطوير وسائل عالية القدرة لدراسة عمليات خلوية أساسية. يعطينا التسلسل الجينومي بذاته

المعلومات لتصميم مصفوفات الــDNA (Microarrays) (انظر المقطع 2.7.4) على شرائح زجاجية لدراسات وتطبيقات مختلفة. كما تساعدنا معرفة تسلسل الجينوم على تصميم أدوات محو (Deletion) في مناطق مختلفة من الجينيوم بهدف دراسة وتحليل الوظيفة (انظر المقطع 3.2.5).

تسمح المصفوفات (التى تحتوي على تسلسلات تمثل معظم الــDNA المنسوخ) بدراسة النمط النسخي (Transcriptional profile) أو ترانسكريبتوم (Transcriptome) عند الكائن الحي تحت أي من ظروف النمو. إن مقارنة نتائج المصفوفات لجهة التعبير الجيني في ظروف اختبارية مختلفة، قد أدت إلى كشف جينات مرتبطة بعمليات الإفراز ومسارات انتقال الإشارات (Transduction pathway) والعمليات المُمْرِضة والعديد من العمليات الخلوية المنسقة. في الفطريات، تبدو فائدة المصفوفات جلية لجهة كشف التعقيد المرتبط بعملية النمو والتمايز (Differentiation) والأيض وإنتاج مركبات الأيض الثانوية والاستجابة للضغوط الناتجة من إنتاج عالٍ من بروتين، والعديد من العملية المرتبطة بالتقانة الحيوية. تبقى نقطة ضعف وحيدة هي أن التحليل على مستوى الــRNA أو الترانسكربتوم، يبين التغيير في النسخ بدون أن يعطي فكرة عن انعكاس التغييرات على مستوى البروتين الناتج منها.

إن ازدياد المعلومات عن تسلسل الــDNA ساهمت أيضاً بتطوير تقنيات أخرى. ومن أكثر هذه التقنيات تطوراً هي دراسة وتحليل البروتينات لكامل الكائن الحي (بروتيومك Proteomic)، حيث يتم استخلاص كل البروتينات من خلايا كاملة (Cell extracts) أو من جزء محدد في الخلية (Cell fraction)، ثم يتم فرزها بالرحلان الكهربائي ذي البعدين أو الاتجاهين في هلام بوليأكريلامايد (Polyacrylamide)، التي يتم الفرز فيها بناء على الشحنة الكهربية وحجم البروتينات. ثم يتم نزع بُقع البروتين من الهلام ويُستخلص البروتين ويُهضم بأنزيم تربسين، ثم يتم تحليلها بتقنية قياس الكتلة الطيفي أو سبكترومتري (MS أو Mass spectrometry). بعد ذلك نقوم بمقارنة نتائج الفحص بيانات المعلومات الإلكترونية

للــDNA والبروتين، تتم المقارنة، بالتحديد، بمنتجات افتراضية لقطع نظري بواسطة تريبسن (Tryptic product) وذلك لمعرفة وتشخيص البروتين قيد الدراسة. تستخدم هذه الطريقة لاختبار التغييرات الحاصلة بمستوى البروتين نتيجة التغييرات في ظروف اختبارية مختلفة، كما تستعمل أيضاً لدراسة حالة البروتين. إن طريقة البروتيوم هذه (Proteome analysis)، تستطيع تحليل جزء من بروتينات الخلية وليس كلها، على عكس تحليل الــRNA (Transriptomic) الذي يفيد عن تغيرات النسخ لكامل الجينات المعروفة. لا شك أن تطوير طرق الاستخلاص والفرز للبروتينات (بدون الرحلان الكهربائي) وخاصة تلك الموجودة في غشاء الخلية سيساهم في جعل تحليل البروتيوم أكثر فعالية. وكما أن تحليل الترانسكريبتوم لا يعكس وجود البروتينات، كذلك تحليل البروتيوم لا يعكس نشاط البروتينات الفعلي ودورها في عمليات الأيض.

هذا ما أدى إلى تطوير الميتابولومك (Metabolomics)، التي نعني بها دراسة كمية منتجات الأيض ومستواها داخل الخلية وذلك بواسطة تقنية الــMS المرتبطة بتقنية الكروموتوغرافية الغازية (GC-MS) أو الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء (LC-MS) أي (High-performance liquid Chromatography Mass-Spectrometry). ويُعتبر الميتابولوم (Metabolome) الناتج من هذه التقنية يعكس بشكل أفضل الواقع داخل الخلية والتغيرات الخلوية الأيضية الحاصلة بها. وقد تم مؤخراً استعمال هذه الطرق (GC-MS, LC-MS) لإجراء مسح تحليلي سريع وشامل لــ6000 سلالة من الخميرة منقوصة جين محدد (Knock-out) (انظر المقطع 3.2.5)، وذلك باستعمال الوسط الغذائي الذي نمت فيه الخلايا، ذلك بهدف تحديد بصمتها الأيضية (Metabolic fingerprinting) وما نتج من محو جين محدد لجهة الأيض (انظر أيضاً الفصل الثاني عشر).

ولكن، وبالرغم من الكفاءة العالية لهذه التقنيات، لا تستطيع واحدة بمفردها أن تعطي صورة كاملة عن العلاقة المعقدة بين الجينوم والصفات الظاهرية (Phenotype)، فلا بد من أجل ذلك من استعمال مجموعة من التقنيات يكمِّل بعضها بعضاً.

6.5 الفطريات في تطبيقات التقانة الحيوية

Biotechnological applications of fungi

تهدف الهندسة الوراثية للخمائر والفطريات الخيطية إلى دراسة وظائفها وخصائصها الحيوية المختلفة، كما تهدف أيضاً إلى القيام بتحوير بعض السلالات في إطار تطبيقيات محددة للتقانة الحيوية. وبالرغم من أن الهندسة الوراثية متطورة بشكل جيد في عدد محدود من الأصناف، فإن نجاحها في أصناف وسلالات أخرى لا يتطلب إلا وضع جهد كاف لذلك. يبين الجدول 3.5 أصنافاً ذات أهمية تجارية. يعتبر كل منتج هدفاً من أهداف التقانة الحيوية والهندسة الوراثية لجهة التحسين، خاصة في إنتاج الأنزيمات والمضادات الحيوية.

إن استعمال الخمائر والفطريات الخيطية لإنتاج بروتينات غريبة (Heterologous) (أي أنها لم تكن مُنتَجة من قبل، وتم إدخال المورث المشفِّر لها إلى السلالة المضيفة بعد انتساخه وعزله من صنف آخر) هو موضوع مناسب للمناقشة والدراسة المقارنة. وسبب ذلك أن الكثير من الخمائر والفطريات تستعمل كمضيف لإنتاج بروتينات غريبة (انظر أيضاً الفصل الحادي والعشرين)، ولقد تقدمت هذه التقنية بشكل مرض للاستعمال التجاري والبحث العلمي، ولا زالت تخضع للتحسين والتطوير. من أجل فعالية عالية في هذا النظام، لا بد من مستوى إنتاج عالٍ لهذا البروتين الغريب، أكان لهدف تجاري أو البحوث العلمية، كما لا بد من أصالة (Authentic) خصائص المنتج، أي أن يكون أقرب ما يمكن للبروتين الطبيعي في الخلية الأم.

1.6.5 إنتاج البروتين: أهمية ألافراز

Protein production: the importance of secretion

يتم إفراز معظم الأنزيمات المتوفرة للأغراض التجارية (من قبل الخلية المضيفة) إلى الوسط الخارجي، هناك أيضاً بعض الأنزيمات المهمة التي تُستخلص

من كتلة الخلايا الحيوية. بالنسبة إلى المؤسسة تجارية تُعتبر أهم فائدة أو حسنة لنظام إفراز الأنزيم المنتج (مقارنةً بتراكم المنتج داخل الخلية) هي سهولة وتدني تكلفة الاستخلاص والتنقية. يُفترض أن تكون الأنزيمات المفرزة مطوية بشكل سليم نظراً إلى أن نظام الإفراز في الخلية يتولى ضبط عملية الالتفاف البروتيني. بينما في حال الإنتاج العالي للأنزيمات داخلياً، فإنه يؤدي إلى التفاف بروتيني غير سليم (Improper folding) وبالتالي نقص في نشاطه وفعاليته. كما يمكن فقدان جزء من البروتين (لجهة نشاطه وفعاليته) خلال عملية الاستخلاص الصعبة والباهظة التكلفة مما يؤدي إلى نقص المحصول المنتج. نشير هنا إلى أن منظومة الإفراز في الخلية هي موقع لعمليات إضافة سكريات إلى البروتين المنتج وتكوين كلايكان (Glycans)، من الجدير ذكره أيضاً أن عملية الإفراز تتزامن مع عملية السَّكرلة (ربط السكريات بالبروتين Glycosylation) التي تلعب دوراً أساسياً في ثبات البروتين وفعاليته تحديد بُنيته. وتتم السَّكرلة بلصق مجموعة من السكريات إما على النيتروجين N (N-linked) التابع للحمض الأميني أسبراجين (Asparagine) وإما على الأكسيجين O (O-linked) التابع للحمض الأمينى سيرين أو ثريونين (Serine or threonine)، ويمكن أن يضاف السكر على الموقعين في نفس البروتين. إن محتوى تركيب السكر المعقد كلايكان (glycan) الذي يُربط بالبروتينات السكرية المُفرزة يختلف من صنف إلى آخر، وبالتالي فإن سكرلة البروتين الغريب لن تكون متطابقة عند تصنيعها في أصناف مختلفة.

إن مدى أهمية هذه المشكلة وتأثيرها يعتمد على وجهة استعمال البروتين. ستكون هذه المشكلة ذات أهمية بالغة إذا استُعمل البروتين للعلاج عند الإنسان، حيث تختلف السَّكرلة عنها في الفطر، وبالتالي فإن البروتينات ذات السَّكرلة المختلفة ستواجَه وتُهاجم من قبل جهاز المناعة وتُزال من الدم لأنها ستعتبر مستضدات غريبة (Foreign antigens)، ولن تؤدي الهدف المنشود. أما النشاط الأنزيمي فيمكن أن لا يتأثر بذاته نتيجة السَّكرلة المختلفة.

الجدول 3.5: منتجات مفيدة من الخمائر والفطر الخيطي. تعد هذه المنتجات هدفا للتقانة الحيوية من أجل تحويرها وتحسينها. الكائنات المعدلة وراثياً هي الأكثر تطوراً في إنتاج المضادات الحيوية والأنزيمات

المنتجات	وجهة الاستعمال	الخميرة(*)	الفطر الخيطي(*)
كتلة حيوية	أغذية	*S. cerevisiae*	*Agaricus bisporus, Fusarium venenatum*
إيثانول	بيرة والنبيذ	*S. cerevisiae*	
CO_2	خبز ونبيذ	*S. cerevisiae*	
سلفايت sulphite	مادة حافظة في البيرة	*S. cerevisiae*	
منكهات lactones، peptides، terpenoids	أغذية ومشروبات	*S. cerevisiae, Pichia guilliermondii, Sporobolomyces odorus*	*Trichoderma viride, Gibberella fujikuroi, Mucor ciricinnelloides, phycomyces blakesleeanus.*
أحماض دهنية غير مشبعة متعددة polyunsaturated	أغذية	*Cryptococcus curvatus*	*Mortierella alpina, Mucor ciricinelloides*
أحماض عضوية (حمض الخل، حمض الستريك، حمض كلوكونيك gluconic، حمض إيتاكونيك itaconic)	مواد حافظة للأغذية، مركبات غذائية، تصنيع كيميائي	*Yarrowia lipolytica*	*Aspergillus niger, Aspergillus terreus*
مضادات حيوية (بنسلين، سيفالوسبورين cephalosporin، بوليكتيد polyketides)	رعاية صحية		*Penicillium chrysogenum, Acremonium chrysogenum, Penicillium griseofulvum, Aspergillus tamorii*
أنزيمات متشابهة (أمليز amylases،	غذاء، تصنيع ورق ومواد	*Kluyveromyces lactis*	*Aspergillus spp., Rhizopus spp.,*

سلوليز cellulases، بروتييز proteases)	تنظيف		*Trichoderma spp.*
بروتينات غريبة المصدر heterologous proteins	غذاء، مواد علاجية	*S. cerevisiae, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Pichia angusta, Yarrowia lipolytica*	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans Trichoderma reesei*

(*) الأصناف الأساسية فقط.

تُعتبر قدرة الكائن الحي المضيف على الإفراز بشكل فائق الفعالية هي صفة إيجابية مفضلة ولكنها ليست دائماً ضرورية. إن الأصناف التي تفرز أنزيمات في حياتها الطبيعية يمكن اختيارها للاستعمال كخلية مضيفة لإنتاج البروتينات الغريبة (Heterologous). قد استغلت لإفراز البروتينات مشابهة (Homologous). هناك العديد من أصناف الفطريات الخيطية التي تُفرز أنزيمات تُحلِّل المواد العضوية المسلسلة، وذلك بكميات كبيرة خاصة عند زراعتها على مستوى مخبري صناعي أو تجارية. وليس من المستهجن أن نرى بأن الفطريات الخيطية تنتج البروتينات المشابهة المُسوَّقة أكثر بعشرة أضعاف مما تنتجه الخمائر. وتبقى الخمائر والفطريات مضيفاً مفضلاً لكلٍ منها صفات إيجابية كثيرة تجتذب المؤيدين.

2.6.5 بروتينات غريبة (مختلفة الأصل) من الخمائر

Heterologous proteins from yeast

يتم استعمال الخميرة S. cerevisiae بشكل واسع في إنتاج الخبز والكحول وهي تعتبر آمنة للاستهلاك من الناحية الصحية. لقد دُرست طرق نقل الجينات وضبط تعبيرها بشكل مستفيض في خميرة *S. cerevisiae* ما جعلها مألوفة علمياً وجذابة لاختيارها كمضيف لإنتاج بروتينات غريبة (Heterologous). ولقد تم إنتاج عدد كبير من البروتينات الغريبة بعد إدخال مورثاتها في خميرة *S. cerevisiae* وأدى ذلك إلى إنتاج محصولٍ كافٍ للتجارة والتسويق (مثل بروتين

الأنسولين وزلال المصل البشري Human serum albumin and human insulin). ولكن بالرغم من هذه الحسنات هناك عقبتان أساسيتان عند استعمال هذه الخميرة كمضيف لإنتاج بروتينات غريبة، أولها المبالغة بالسَّكرلة (Hyperglycosylation) حيث إن السكريات المرتبطة بــN (N-linked) تتكون من سلسلة كاربوهيدرات طويلة جداً من نمط الــ Mannose، التي لا توجد في كلايكان (Glycans) المستعمل في السَّكرلة عند البشر. لوحظ من جهة أخرى أن زلال المصل البشري (Human serum albumin) لا تتم إضافة السكريات إليه عندما يُنتج في الخميرة، كما أن البروتين الأصلي الطبيعي ليس مُسَكْرَلاً (Not glycosylated). أما المشكلة الثانية فإنها تكمن في مستوى الإفراز (للمحصول) الضعيف في هذه الخميرة في الأصل.

لقد تم تطوير عدد من أنظمة التعبير في الخميرة لإنتاج مواد أولية شائعة الاستعمال بتكلفة قليلة أو لإنتاج بروتينات غريبة بشكل أكثر فعالية. هناك مثلاً الــ*Kluyveromyces lactis* التي تنمو على مصول اللبن المحتوية على سكر اللاكتوز، وتستعمل تجارياً لإنتاج أنزيم المحلل اللاكتوز β-galactosidase حيث يُستعمل مُحرك قوي يمكن تحفيزه (Inducible promoter) للتحكم بإنتاج البروتين الغريب المطلوب. كما تم استعمال الــ K. lactis لإنتاج أنزيم كايموسن (Chymosin) على مستوى تجاري، كما تم إنتاج عدد آخر من البروتينات المفرزة بمحصول إنتاج أعلى مما سبق نشره في التقارير بشأن S. cerevisiae. تم أيضاً استغلال خمائر مُستهلِكة للميثانول، تدعى Pitchia angusta والــ P. pastoris، لأنها تمتلك محركاً قوياً يُحفَّزُ (Inducible) بالميثانول لإنتاج أنزيم أكسدة الميثانول (Methanol oxidase)، تم استعمال هذ المحرك للتحكم بمورث البروتين الغريب. لقد أدى كل من الــPitchia angusta والــP. pastoris إلى إنتاج محاصيل عالية المستوى من بروتينات غريبة مختلفة، وخاصة عندما يكون النمو كثيفاً جداً في المفاعلات الحيوية (Bioreactors). كما أن المبالغة في السَّكرلة (Hyperglycosylation) لا تبدو أنها مشكلة عند إنتاج مستوى عالٍ من البروتين في كل من *P. pastori*. إن الصنف *Yarrowia lipolytica* (الشكل 1.5 ب) هو

غير اعتيادي لأنه يستطيع النمو باستعمال بعض أنواع الهيدروكربون، ولكن تلك القدرة لم تُستغل بعد لجهة استعمال المحركات المناسبة لتحفيز تعبير المورثات الغريبة. لقد استعمل المحرك المنضبط التابع للمورث المشفِّر لأنزيم بروتييز القاعدي المفرز (Secreted alkaline protease) ، ولم يتم استعمال محركات أخرى متوفرة. وتتميز Yarrowia lipolytica من غيرها من الخمائر بقدرتها العالية على إفراز أنواع كثيرة من البروتينات، ما يدل على فعالية نظامها الإفرازي.

يجب على كاسيت التعبير (Expression cassettes) التي تُستعمل في المضيف لإنتاج بروتين معين غريب (Heterologous) أن تتميز بخصائص مهمة (الشكل 4.5). يتم دمج الجين الغريب (أو الــcDNA لتجنب المشاكل الناتجة من قص الدخلون والوصل Splicing في الخلية المضيفة) مع محرك من الخميرة وإشارة وقف النسخ. يُفضل عادة إستعمال محركات من جينات المضيف و لصقها بالجين الغريب، بالرغم من أن محركات عديدة تعمل بفعالية عند نقلها من صنف إلى آخر (على سبيل المثال هناك محرك جين الــPhosphoglycerol kinase أو PGK من خميرة S. cerevisiae الذي يمكن استخدامه في خميرة K. lactis). كما لا بد من أجل إفراز البروتين إلى خارج الخلية من سلسلة أحماض أمينية، بطول 15 إلى 30 حمضاً أمينياً تسمى التسلسل الإشارة (Signal sequence)، تقع على الطرف النيتروجيني (N-terminus) لتسلسل البروتين (انظر الشكل 15.4). يتم قطع تسلسل الإشارة بواسطة أنزيم بيبتيدايز خاص (Endopeptidase) حال دخول البروتين إلى داخل الشبكة الاندوبلازمية (Endoplasmic reticulum أو ER)، الذي يعتبر نقطة بدء عمليات إفراز البروتين في الخلايا الحقيقية النوى. إن موقع قطع (Cleavage point) تسلسل الإشارة من البروتين لا يعتمد على تسلسل خاص، وإنما يعتمد على حجم تسلسل الإشارة وتوزيع الشحنات (الشحنات الموجبة الموجودة على الطرف N من سلسلة البروتين) وعلى الجزء غير المحب للماء (Hydrophobic) في تسلسل الإشارة. لقد تم تجريب تسلسلات إشارة مختلفة (أي إشارة الإفراز) من بروتينات مشابهة أو غريبة (Homologous or heterologous) وكذلك تم تركيب تسلسلات إشارة اصطناعية، وتبين أن العديد منها ذو فعالية جيدة لجهة الإفراز. لقد أصبح من المعتاد إضافة تسلسل قصير آخر بعد إشارة الإفراز هذه وقبل الطرف N للبروتين

المستهدف، يسمى هذا التسلسل الأولي Pro-sequence ويتواجد بشكل طبيعي في عدد كبير من البروتينات المتشابهة التي تُفرَزُ خارج الخلية، ويعتبر مساعداً في عملية التفاف البروتين. يُستعمل في الغالب تسلسل الإشارة (Signal sequence) والتسلسل الأولي (Pro-sequence) من بروتين عامل التزاوج α (α-mating factor) لخميرة S. cerevisiae في الكاسيت التعبيري. يحتوي التسلسل الأولي (Prosequence) حمضين أمينيين قاعديين هما لايسين وأرجينين (Lysine-Arginine) على طرفه، ثم يتم قطعه في جسم كولجي (Golgi body الذي يلعب دوراً مهماً في عملية إفراز البروتين ونضجه) بواسطة أنزيم خاص أندوبيبتيدايز (Endopeptidase) يقطع في موقع يتلو الثنائي لايسين–أرجينين هذا ما يؤدي إلى تحرير البروتين الناضج ذي طرف N صحيح. يسمى هذا الأنزيم (الــEndopeptidase) Kex2p في خميرة S. crevisiae، كما يوجد شبيه له في خمائر أخرى وفطريات خيطية.

إن إنتاج الكثير من البروتينات الغريبة من قبل كائن مضيف تعطي كميات محدودة لا تفي للأغراض التجارية أو الدراسة المخبرية، أو أنها أحياناً تختلف في تركيبها ووظيفتها عن البروتين الطبيعي الأصيل. بالنسبة إلى هذه المشكلة، لا تختلف أنظمة التعبير في الخمائر عنها في الكائنات الأخرى، وهناك مساع حثيثة ومستمرة يتم إدخالها على طريقة العمل للتمكن من تجاوز تلك الصعوبات. إن استخدام ناقل ذي قدرة عالية على التضاعف قد يسبب نقصاً في توفر عوامل النسخ نتيجة ارتباطها بعدد جزيئات الناقل الكثيرة (عملية تسحيح Titration) فتصبح كميتها محدودة في الخلية. يحصل هذا في خميرة S. cerevisiae بالنسبة إلى محرك GAL1 الذي يُحفَّز بالكالاكتوز، ولكن يمكن تجاوز مشكلة التسحيح Titration من خلال زيادة تعبير البروتين Gal4p الذي يرتبط مع المحرك. ولقد أظهرت نتائج كلتا المحاولتين نتائج مشجعة، ولكنها لم تحل المشكلة بشكل نهائي.

إن أكثر العقبات التي تؤدي إلى انخفاض مستوى المحصول من البروتين المطلوب ترتبط بعمليات تحصل بعد الترجمة (Post-translational)، أي مسارات الإفراز أو حصول تحليل وإتلاف للبروتينات بواسطة بروتيايز (Protease). لذلك

تمت محاولة استعمال سلالات طافرة في أنزيمات تحليل البروتينات (Protease- deficient mutants)، كما تم السعي إلى جعل أنزيم لتحليل تسلسل الإشارة Kex2 (Signal peptidase) أكثر دقة وتخصصًا في أدائه. لقد ساعدت الاستراتيجيتان في تحسين الإنتاج بدون أن تحل المشكلة جذرياً. تحصل عملية التفاف البروتين أثناء الإفــراز في الشبكــة الأندوبلازميــة (ER) ذلك بمساعــدة بروتينــات مرافِقة (Chaperone). كما يوجد في الــER أنزيمات مساعدة للالتفاف تسمى Foldases تُسرع عملية الالتفاف من خلال تكوين رابطة ثنائية سلفيد (Disulphide bond). وقد نجح تحفيز التعبير لبروتينات Chaperone و الــFoldases في خميرة *S. cerevisiae* من تحسين مستوى الإنتاج فقط لبعض البروتينات الغريبة (Heterogenous). كما اعتُمدت محاولة التطفير (إنشاء طفرات بعامل مُطفِّر) لتحسين إفراز البروتين الغريب (إحداث طفرات عشوائية في سلالة يتلوها عملية انتقاء) وأدت إلى نتائج إيجابية، وفي بعض الأحيان تم تحديد الجينات الطافرة. فقد وجدت الطفرات في مورثات تلعب دوراً في كل مستويات مسار إنتاج البروتين التي تشمل النسخ والإفراز والتحليل والسَّكرلة (Glycosylation). ستبقى طريقة التطفير معتمدة كوسيلة لتحسين الإنتاج، ولكن معظم هذه الطفرات متنحية (Recessive) وليس من السهل إدخالها في السلالات ذوات المجموعة الصبغية المتعددة (Polyploid) والمستخدمة لأغراض تجارية لذلك تبقى طريقة تحوير جين معين مستهدف هي طريقة مكمِّلة لسابقاتها وذات أهمية عالية.

3.6.5 بروتينات غريبة من فطريات خيطية

Heterologous proteins from filamentous fungi

إن النواقل في الفطريات الخيطية لا تختلف كثيراً عن تلك التي تُستعمل في الخميرة، وكما سبق في هذا الفصل (المقطع 3.2.5) فإن الفارق الأساسي هو أن التضاعف الذاتي المستقل (Autonomous replication) ليس مُحبذاً في الفطريات الخيطية المعتمدة لأغراض تجارية، وأن معظم النواقل (ما عدا حالات خاصة للأبحاث) تم تصميمها لتلتحم مع جينوم الفطر. وعلى غرار نواقل الاندماج في الخمائر، فإن نواقل

الاندماج في الفطر الخيطي تزيد من احتمال استقرار وثبات الجين المستهدف (ولو بشكل غير مضمون)، ولكنها لا تضمن الحصول على مستوى التعبير المطلوب ولا عدد النُسخ (الناقل الحامل للجين المستهدف) التي تم دمجها في الجينوم. ومن الناحية العملية، هناك اختلافات كبيرة في مستوى إنتاج البروتين الغريب عند تحوير سلالات الفطر المختلفة. من أسباب هذه الاختلافات نذكر نقطة الاندماج في الجينوم، إذ إن المناطق المختلفة من نفس الجينوم لا يتم نسخها بنفس الفعالية والنشاط. لقد أظهرت النتائج أنه بالإمكان زيادة عدد نسخ الناقل المدمجة بالجينوم من خلال تسليط ضغط انتقائي كما في التجربة البارعة التي أجريت على الـ ـ*A. niger* حيث استُخدم الجين amdS من الـ *A. nidulans* في المقطع 3.2.5. ولكن وبالرغم من الفعل الإيجابي لزيادة عدد النُسَخ (لجهة إنتاج البروتين) يجب أن لا نتخطى حداً معيناً حيث يتوقف ازدياد البروتين، أو قد يُصبح ذا مفعول عكسي. على سبيل المثال، إذا تعدى عدد نُسخ مُحرك glaA (المأخوذ من *A. niger*) العشرين نسخة في الخلية الواحدة فسيؤدي ذلك إلى نقص في عوامل نسخ أساسية (Transcription factors) بسبب عملية التسحيح. هناك ملاحظات مماثلة في الخمائر (انظر المقطع 2.6.5) حيث تم تجاوز هذه المشكلة عن طريق استراتيجية تحفيز إنتاج عوامل النسخ والتي يمكن أن تحل المشكلة في الفطريات الخيطية أيضاً.

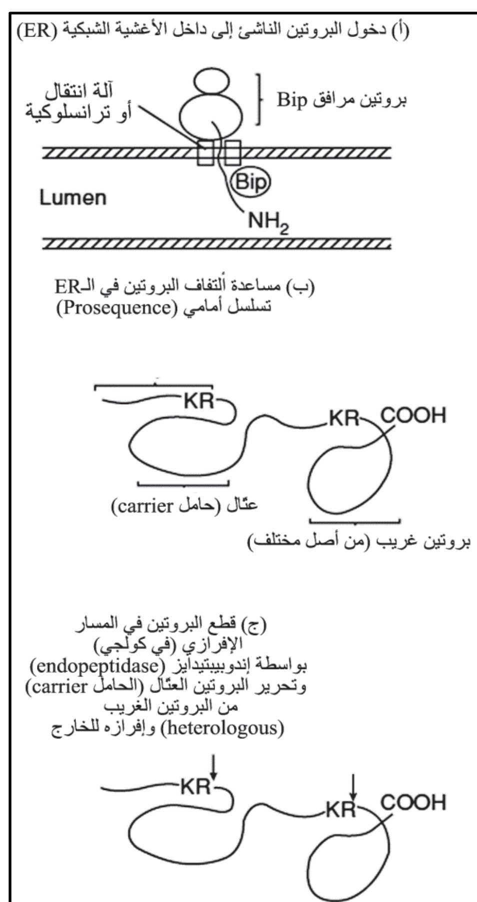
إلى جانب إستراتيجية تحديد عدد نُسَخ الجين المندمجة التي ذكرت للتو، فإن استخدام المواد المُطفِّرة على سلالات منتجة للبروتين ثم انتقاء وعزل الخلايا الطافرة ذات الإنتاج العالي، هي أيضاً إستراتيجية فعالة لتحسين الإنتاج. وفي الحقيقة فإن المزج بين استراتيجية التحوير الجيني المحدد واستراتيجية التطفير العشوائي تعطي نتائج أفضل في عملية تحسين إنتاج البروتين الغريب. هناك استراتيجيتان أخريان للتحوير الجيني المحدد تُستعمل بشكل روتيني (انظر الفصل الحادي والعشرين). إن أكثر أصناف الفطر استعمالاً لإنتاج البروتينات الغريبة تقوم بإفراز أنزيمات تحليل البروتين أو بروتيايز، التي يمكن أن تُتلِف البروتين الغريب. هناك طريقتان لحل هذه المشكلة، الأولى تقتضي التحوير الجيني لتعطيل أو محو المورث المسؤول عن إنتاج البروتيايز. أما الاستراتيجية الثانية فهي الالتحام الجيني (Gene fusion) بين الجين المستهدف ومورث لبروتين "عتَّال"

(Carrier) يتم إفرازه من الخلية سريعاً (يتم دمج الجين المستهدف في موقع تال للجين العتَّال). ومثال على البروتين العتَّال نذكر كلوكوأمليز (Glucoamylase) في الــ *A. niger* أو سيلوبيوهيدروليز (Cellobiohydrolase) من الــTrichoderma reesei. عندما تم استخدام هذه الاستراتيجية لإنتاج كايموسين بقري (Calf chymosin) والذي يُحلل البروتين (بروتيايز) بذاته، فقد قام بقطع البروتين الــ"كيمرة" Chimera (في موضع التسلسل الأولي) وبالتالي فصل نفسه عن العتَّال كلوكوأمليز (Glucoamylase). لا ينطبق ذلك بطبيعة الحال على باقي البروتينات الغريبة، حيث يجب إضافة تسلسل قابل للقطع بشكل خاص (Cleavable protease site) في نقطة الالتحام بين العتّال والبروتين المستهدف. يُستعمل عادة موضع مؤلف من تسلسل ثنائي لايسين–أرجينين، الذي يُقطع بواسطة بروتيايز Kex2 في الخميرة، كما تبدو هذه الطريقة فاعلة أيضاً في الفطر الخيطي. تؤدي استراتيجية البروتين الملتحم الــ"كيمرة" إلى رفع مستوى إنتاج البروتين المفرز ومستوى ثبات الــmRNA، وسرعة مروره في نظام الإفراز، ولكن ميكانيكية هذه التحسينات غير معروفة.

يُعد الكشف عن نقاط الاختناق (عنق الزجاجة Bottle-neck) التي تحول دون إنتاج عال من البروتين المفرز ذي الخصائص الأصيلة هو نقطة البداية لوضع الاستراتيجية المناسبة لحل المشكلة وتحسين الإنتاج. من الواضح أن عوامل عديدة ومختلفة تجتمع لتشكل نقطة اختناق في نظام التعبير في الخميرة، وتختلف أهمية وأدوار تلك العوامل باختلاف البروتين الغريب المُصنَّع. هناك مثلاً استعمال الجين الغريب لشفرات (Codons) غير مفضلة في الفطر المضيف، ووجود تسلسلات تؤدي إلى عدم ثبات الــmRNA وتكسيره، واختلاف آلية الالتفاف والإفراز للبروتين، وأيضاً وفرة البروتيايز، كلها تساهم في اختناق المنظومة في عنق الزجاجة. هناك أيضاً المبالغة في السَّكرلة (Hyperglycosylation) التي تشكل عائقاً وإن كان بنسبة أدنى من تلك التي في الخمائر. إضافة إلى ذلك نذكر اختلاف نمط السكريات المضافة خلال السّكرلة في الفطر الخيطي بالنسبة إلى الثدييات، الذي يترتب عليه تأثير كبير في حالة البروتينات العلاجية. تتم حالياً

دراسة تركيب وهيكل الكلايكان (Glycan) المُستعمل في السكرلة عند الفطر الخيطي، وكذلك انتساخ مورثات أنزيمات تصنيع الـــGlycan، مما يفتح المجال في المستقبل أمام التحوير الجيني لجهة نمط السّكرلة (Glycosylation).

إن التفاصيل الضرورية عن مسارات الإفراز في الفطريات الخيطية تبدو مشابهة نوعياً لما هي عليه في الخمائر، التي دُرست بإسهاب وتفصيل أكثر. لقد تم انتساخ بعض الجينات المُشفِّرة لبروتينات المرافقة الـ Chaperones والالتفاف الـــ Foldases المسؤولة عن التفاف البروتين، كما تم انتساخ جينات مُشفِّرة لبروتينات مرتبطة بنقل الحويصلات (Vesicular transporter). بالرغم من عدم ورود تقارير تسجل نجاحاً في تحوير مسارات إفراز البروتينات، إلا أن الأدوات اللازمة أصبحت متوفرة الآن.



الشكل 16.5 : نظام التفاف ومعالجة بروتينات ملتحمة (fusion) ومفرزة في الفطريات الخيطية. (أ) دخول البولييبتيد الناشئ إلى داخل الـ ER. يقوم أنزيم إزالة الإشارة (signal peptidase) بقطع الإشارة المسؤولة عن توجيه البولييبتيد إلى الـــER، ويتم ذلك القطع في داخل الـــER حيث يصبح البروتين بدون إشارة. في وسط الـــBIP نجد بروتين يرافق عملية الالتفاف الأولى. هناك بروتينات أخرى وأنزيمات الالتفاف (foldase) في داخل الـــER (انظر النص). (ب) إلتفاف بروتين ملتحم بكامل طوله في الـــER. (ج) قطع البروتين الملتحم (fusion protein) في جسم كولجي (Golgi body) بواسطة أنزيم ببتيديز Kex2p في خميرة S. cerevisiae لتحرير البروتين الغريب وإفرازه خارج الخلية بمساعدة حويصلات

Further reading 7.5 مراجع للتوسع

Arora, D. K. (ed.) *Handbook of Fungal Biotechnology*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston. [et al.] *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. 5th ed. New York: John Wiley and Sons, 2002.

Castrillo, J. O. and S. G. Oliver. "Yeast as a Touchstone In Post-Genomic Research: Strategies for Integrative Analysis in Functional Genomics." *Journal of Biochemical and Molecular Biology*: vol. 37 (2004), pp. 93-106.

Gellissen, G. and C. P. Hollenberg, "Application of Yeasts in Gene Expression Studies: A Comparison of Saccharomyces Cerevisiae, Hansenula polymorpha and Kluyveromyces lactis. A Review." *Gene:* vol. 190 (1997), pp. 87-97.

Gow, N. A. R. and G. M. Gadd (eds.). *The Growing Fungus*. London: Chapman and Hall, 1995.

Gow, N. A. R., G. D. Robson and G. M. Gadd (eds.). *The Fungal Colony*. Cambridge, MA: Cambridge University Press, 1999.

Luban, J. and S. P. Goff. "The Yeast Two-Hybrid System for Studying Protein--Protein Interactions." *Current Opinions in Biotechnology:* vol. 6 (1995), pp. 59-64.

MacKenzie, D. A., D. J. Jeenes and D. B. Archer, "Filamentous Fungi as Expression Systems for Heterologous Proteins." in: *Genetics and Biotechnology*, vol. 2, *The Mycota*, 2nd ed. U. Kuck. Berlin: Springer-Verlag, 2004, pp. 289-315.

Oliver, R. P. and M. Schweizer (eds.). *Molecular Fungal Biology*. Cambridge, MA: Cambridge University Press, 1999.

Talbot, N. (ed.). *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 2001.

Wolf, K. (ed.). *Non-Conventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

الفصل السادس

حركية العمليات الحيوية الجرثومية

Microbial Process Kinetics

Jens Nielsen **جنز نيلسون**

Technical University of Denmark **الجامعة التكنولوجية، الدنيمارك**

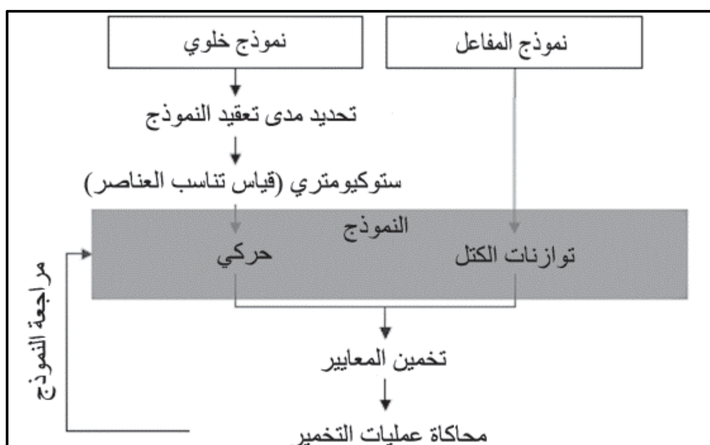
1.6 المقدمة Introduction

إن التوصيف الكمّي (المعيار الكمي) لمسار العمليات الحيوية في الخلية يُعد ضرورة من أجل تصميم عمليات تخمير ناجحة. ولعل أهم معيارين كميين ضروريين لتصميم عمليات التخمير هما المحصول (Yield) والإنتاجية (Productivity)، فبمعرفة هذين المعيارين يصبح بالإمكان مراقبة عمليّة تحويل المواد الأوّليّة (Substrate) إلى منتوج (Product). يُعبِّر "المحصول" عن كمية المُنتَج الذي نحصل عليه انطلاقاً من المادّة الأولية (أو المادة الخام)، أمّا الإنتاجيّة فهي نسبة أو معدل (Rate) تكوّن المنتوج. يمكن حساب هذين المعيارين بسهولة إذ إنهما يشتقان من قياسات تتم خلال التجارب، كقياس كمية المادة الأولية المستهلكة وكمية المنتج النهائي الناتج. ولكن الجانب الصعب هو التنبؤ بتغيّرات هذين المعيارين التي يمكن أن تحصل تحت ظروف العمل، كالتغير في تركيب الوسط الغذائي أو التغيرات في درجة الحرارة...إلخ. ومن أجل القدرة على توقع تلك التغييرات في المحصول والإنتاجية، لا بد من وضع نموذج (Model) حسابي

(انظر الإطار 1.6). وقد يكون هذا النموذج بسيطاً كعلاقة ارتباط تجربية (Empirical correlation) بين سرعة تكوُّن المنتج بالنسبة إلى تركيبة الوسط الغذائي، أو قد تكون نموذجاً معقداً (معادلة) يدخل في حساباتها كل التفاعلات الخلوية الأساسية أثناء تحويل المادة الأوّليّة إلى منتوج معيّن. بغضّ النظر عن مدى تعقيد النموذج الحسابي وبُنيته، فإنّ وضع نموذج توصيف كمي لعملية التخمير تتضمّن عدة مراحل (انظر الشكل 1.6).

إنّ مفتاح النجاح في تصميم نموذج حسابي هو معرفة مدى تعقيد (Complexity) هذا التصميم. وهذا يعتمد بشكل كبير على الهدف المنشود، وما هو المقصود من استعمال النموذج، سيناقش هذا الموضوع في الفقرة 1.2.6. ولمعرفة مدي تعقيد النموذج لا بد من تحديد وتعريف التفاعلات التي ستجري، وتحديد ستوكيومتريتها (قياس تناسب العناصر فيها) وبعد معرفة مقدار تعقيد النموذج، يتم توصيف سرعة التفاعلات الخلوية (الداخلة في النموذج) بمعادلات ومقادير حسابية أي يتم فيها تمثيل سرعات العوامل المتغيرة كتركيز المادة الأولية، أو تركيز منتجات الأيض. ويتم التعبير عن هذه الدالاّت (Functions) أحياناً بتغيرات حركية، أو بمقادير جبرية. وهذه مرحلة مهمة في حلقة النَّمذجة (Modeling cycle)، وفي كثير من الأحيان يتم تجريب عدد من المعادلات الجبرية الحركية Kinetic expressions قبل التوصل إلى نموذج حسابي مُرضٍ.

في الخطوة التالية من عملية النَّمذجة يجب تجميع حركيات التفاعلات الخلوية مع نموذج المفاعل حيث تحصل العمليات الخلوية. في هذا النموذج أيضاً نجد وصفاً لتغيُّر تركيز المواد الأولية، والكتلة الحيوية ومنتجات الأيض مع مرور الوقت، وكذلك وصفاً لدفق المواد الداخلة إلى المفاعل الحيوي وتلك التي تخرج منه. يتم عادة إظهار نماذج المفاعل الحيوي (Bioreactor models) بصيغة بسيطة هي "توازنات الكتل" على كامل المفاعل الحيوي، ولكن نماذج أكثر تفصيلاً يمكن أن تُطبّق إذا كان هناك عدم تجانس (Inhomogeneity) في الوسط، الذي يلعب دوراً في العملية (انظر المقطع 3.6).



الشكل 1.6: الخطوات المختلفة للتوصيف الكمي لعمليات التخمر.

الإطار 1.6 نماذج حسابية Mathematical models

النموذج الحسابي هو عبارة عن مجموعة علاقات وارتباطات بين المعايير المتغيرة العديدة في منظومة ما قيد الدراسة. يتم التعبير عن هذه العلاقات بواسطة معادلات حسابية معينة، كما يمكن أيضاً استعمال مقادير منطقية (logic expressions) (أي علاقة سبب/نتيجة أو سبب/تأثير) تُستعمل في تشغيل العملية. ونعني بالمعايير المتغيّرة أي خاصية ذات أهمية في عملية التشغيل، كمقدار سرعة التحريك في المفاعل الحيوي (agitation rate)، وأيضا سرعة إضافة المواد الغذائية (feed rate)، ودرجة الحموضة (pH)، والحرارة للوسط الغذائي، وتركيز المواد الأولية فيه، وتركيز نواتج الأيض، وتركيز الكتلة الحيوية، وحالة الكتلة الحيوية (state of the biomass) التي يُعبَّر عنها بعدد من المركبات الخلوية الوسيطة الأساسية. ومن أجل وضع نموذج حسابي لا بد لنا من اتخاذ حجم شاهد (ضابط) (control volume) تُعتبر فيه كل العوامل المتغيرة متماثلة (uniform)، أي أن قيمة كل واحد من هذه المعايير المتفاعلة لا تتغير أثناء المراحل المختلفة في الحجم الشاهد (الضابط) وتبقى متجانسة. في عمليات التخمير يُعتبر الحجم الشاهد (الضابط) (control volume) هو حجم السوائل في كامل المفاعل الحيوي، ولكن في المفاعلات الحيوية الكبيرة قد يكون الوسط ذا تجانس ناقص (inhomogenous) نتيجة عدم فعالية عملية المزج والخلط. عندها، يكون من الضروري تقسيم المفاعل الحيوي إلى عدة أحجام شاهدة (ضابطة) (انظر القسم 3.6). وعندما يكون الحجم الشاهد (الضابط) هو كامل المفاعل الحيوي، فإما أن يكون الحجم ثابتاً، وإما متغيراً مع الوقت بحسب طريقة تشغيل العملية الحيوية (operation of bioprocess). بعد تحديد الحجم الشاهد يُصار إلى كتابة معادلات توازن للمعايير المتغيرة ذات الأهمية. تقوم معادلات التوازن تلك بتوصيف كيفية تدفق المواد الداخلة والخارجة من هذا الحجم الشاهد (الضابط) وكيفية تحول المواد الموجودة في هذا الحجم. يتم توصيف عملية تحوُّل (conversion) المواد الموجودة ضمن هذا الحجم بواسطة معادلات النسبة (rate equations)، وتعرف أيضاً بالمقادير الجبرية الحركية (kinetic expression)، التي تجتمع مع توازن الكتل (mass balances) لتحدد النموذج الحسابي الكامل (انظر الشكل 1.6).

ومن خلال دمج أو ضم نموذج الحركية (Kinetic) ونموذج المفاعل الحيوي (Bioreactor models) نحصل على توصيف حسابي كامل لعملية التخمير، ويمكن استخدام هذا النموذج لمحاكاة (Simulation) مظهر (Profile) أو حالة العوامل العديدة المتغيرة في العملية، مثلاً تركيز المادة الأولية وتركيز المُنتَج. ولكن قبل التمكن من ذلك لا بد من تحديد القيم لكل واحد من المعايير في النموذج. من هذه المعايير ما يكون على علاقة بالتشغيل وتعتمد علي الطريقة التي يتم فيها تشغيل العملية، مثلاً حجم السائل المتدفق من وإلى المفاعل، أما المعايير الأخرى فهي مرتبطة بالحركية المرتبطة بالمنظومة الخلوية. وللتمكن من تحديد قيم تلك المعايير لا بد من إجراء مقارنة نموذج المحاكاة بمعلومات تجريبية حقيقية، ومن خلال ذلك تخمين قيم المعايير للحصول على تناسب بين النموذج الحسابي والنتائج العملية المخبرية. تسمى هذه العملية تخمين قيم المعايير (Parameter estimation). يمكن تقييم التناسب أو التطابق بين النموذج الحسابي والواقع العملي بالتفحص والمقارنة بالنظر، ولكن من الأفضل اعتماد طرق مقارنة أكثر عقلانية ومنطقية، هناك مثلاً طريقة "تقليل مجموع تربيع قيم الخطأ" (Minimizing the sum of squared errors) بين النموذج الحسابي (الإفتراضي) والتجربة العملية في الواقع. وإذا تبين أن المحاكاة بالنموذج الحسابي تُمثل الواقع بدرجة مقبولة، عندها يُقبل النموذج، أما إذا لم يحصل التطابق في أي مجموعة من المعايير، عندها يُعتبر النموذج الحسابي ضعيفاً، ولا بد من مراجعة نموذج الحركية (Kinetic model) وإعادة حلقة النَّمذجة (Modeling cycle) من جديد.

سنركز فيما يلي على العنصرين الأساسيين المطلوبين لتصميم نموذج حسابي لعملية حيوية، وهما النَّمذجة الحركية (kinetic modeling)، و توازنات الكتل (Mass balances) في المفاعل الحيوي. وسيؤدي ذلك إلى توصيف أنماط مختلفة لتشغيل المفاعل الحيوي، وبالتالي تبيان وتوضيح مسائل تصميمية مبسطة.

2.6 النَمْذَجَة الحركية لنمو الخلية Kinetic modeling of cell growth

يتم استخدام النماذج الحسابية من قبل كل الباحثين في علوم الحياة عند تحليل نتائج تجربة منفردة، وكذلك عند تحليل ومقارنة نتائج مجموعة من التجارب بهدف استنتاج نموذج قادر على تفسير وتبرير ظواهر مختلفة تمت مشاهدتها. لذا فعلماء الحياة يستخدمون النماذج ليتسنى لهم تحليل نتائج التجارب على تنظيم التعبير الجيني، وتبدو أهمية هذه النماذج خاصة عندما يتم استنتاج فكرة معينة من تجارب مخبرية معقدة. ومعظم هذه النماذج الحيوية تعالج الجانب النوعي الوصفي (Qualitative) فقط بدون أن تسمح بمعالجة الجانب الكمي (Quantitative). في الغالب يمكن الانتقال بسهولة من تلك النماذج النوعية اللفظية (Verbal) إلى النماذج الكمية، ولكن يبقى العائق الأكبر في تطبيق تلك النماذج الكمية هو تخمين قيم المعايير التي تدخل في النموذج. وللتوصل إلى ذلك لا بد من قياس دقيق لكمية تلك المعايير المتغيرة، وذلك القياس في ظروف اختبارية مختلفة. لذلك فإن التوصيف الكمي (أو المحاكاة بالنموذج) تسير بموازاة العمل التجريبي المخبري، وعادة ما تكون عملية النَّمذجة محدودة (يُعاق تقدمها) لعدم توفر نتائج مخبرية موثوقة. خلال السنوات العشر الأخيرة حصلت ثورة في التقنيات المخبرية المطبقة في علوم الحياة، وقد مكن ذلك من التقدم السريع في النمذجة الحسابية الدقيقة للعمليات الخلوية المختلفة. كذلك، فإن توفر الحواسيب العالية القدرة قد مكن من حل أكثر المسائل الرقمية تعقيداً في وقت معقول بالنسبة إلى الحاسوب. لذلك يمكن في الوقت الحاضر معالجة نماذج حسابية معقدة لعمليات بيولوجية، كما يمكن التأكد من النتيجة عملياً في المختبر. ولكن تلك النماذج التفصيلية أو الآلية (mechanistic) لا تُستعمل في تصميم العمليات الحيوية، ولكنها تُفيد بشكل أساسي في الأبحاث العلمية الأساسية على الظواهر البيولوجية. في هذا الفصل سيتم التركيز على النماذج الحسابية المفيدة لتصميم عمليات حيوية، ولكن بهدف إعطاء فكرة شاملة عن النماذج الحسابية المختلفة التي تُطبَّق لتوصيف العمليات البيولوجية، سنبدأ بعرض النماذج الحسابية الحركية (Kinetic models) مع مناقشة حول تعقيد النموذج (Model complexity).

1.2.6 بنية النموذج ومدى تعقيده

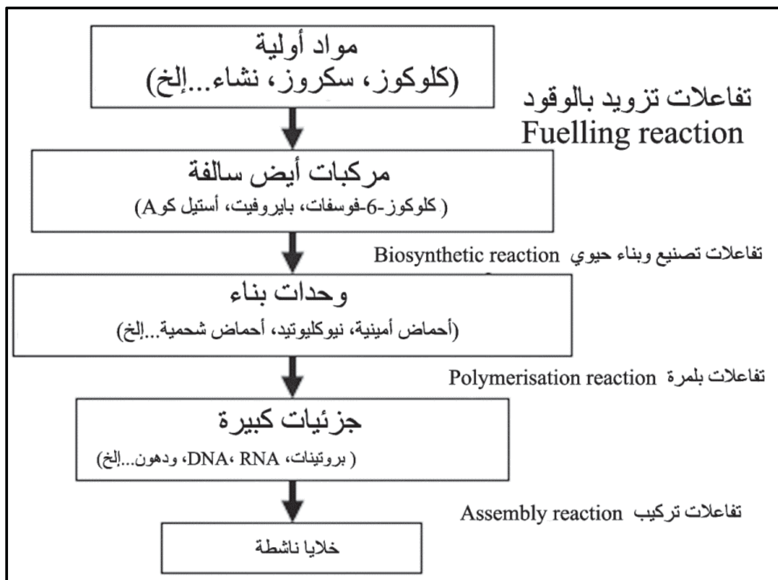
Model structure and model complexity

إن العمليات البيولوجية معقدة جداً بذاتها، فالنمو الخلوي وتكوُّن مركبات الأيض هو النتيجة لعدد لا حصر له من التفاعلات الخلوية والأحداث كالتعبير الجيني وترجمة الـــRNA الرسول إلى بروتين، بالإضافة إلى معالجة البروتين ونضوجه وتحويله إلى أنزيم فعال أو بروتين هيكلي يدخل في البناء، والسلسلة الطويلة من التفاعلات الحيوية والكيميائية التي تُنتج اللبنات الأساسية المطلوبة لبناء الخلية. يمكن تقسيم تلك العمليات والتفاعلات ضمن مجموعات أربع موضحة في الشكل 2.6. من البديهي أنه من غير الممكن إدراج جميع العمليات والتفاعلات وتمثيلها في النموذج الحسابي. ففي عمليات التخمير حيث يكون عدد الخلايا كبيراً جداً يكون هناك نقص في التجانس (Inhomogeneity) إذ تختلف الخلايا في مستوى فعالياتها وأداء وظيفتها، هذا يزيد من تعقيد مسألة النَّمذجة. خلال وضع أسس نموذج التخمير، يتم دائماً تجميع أو تكتيل العمليات والتفاعلات الخلوية كلها. أما درجة التفصيل التي يأخذها النموذج بعين الاعتبار (أي درجة التجميع والتكتل) فإنها تعتمد على الهدف المنشود من النموذج الحسابي.

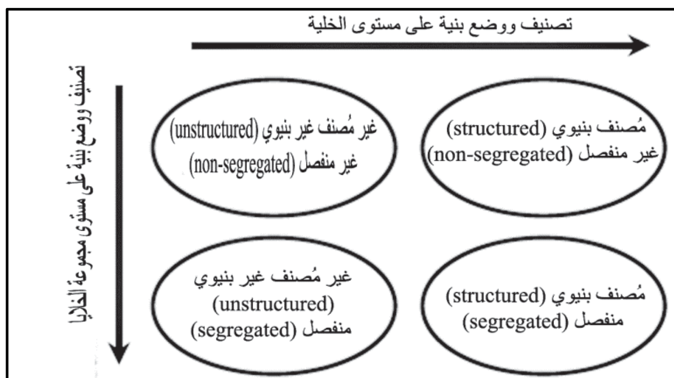
إن نماذج التخمير الحسابية يمكن أن تُقسم إلى مجاميع أربع، وذلك حسب درجة التفصيل التي يشتمل عليها النموذج (الشكل 3.6). أبسط توصيف بين الأنواع الأربعة هو ما يعرف بالنموذج غير البنيوي (Unstructured model) الذي تُوصَّف فيه الكتلة الحيوية بعامل متغير واحد (وهو غالباً التركيز الكلّي للكتلة الحيوية) الذي لا يعتمد العزل والفصل بين الخلايا غير المتطابقة، إذ إنه يفترض أن جميع الخلايا كتلة واحدة تمتلك صفات متطابقة (أي غير مقسمة إلى مجموعات Non-segregated). يمكن أن تتحد هذه النماذج الحسابية مع النموذج الانفصالي (Segregated) حيث يتم توصيف كل فرد في المجموعة بعامل متغير واحد مثل وزن كتلة الخلية أو عمر الخلية. ولكن في حالة النموذج الانفصالي يجب إضافة بُنية إضافية (More structure) ليُصبح معنى النموذج أقوى. ففي النموذج

البنيوي (Structured model) يتم توصيف الكتلة الحيوية بأكثر من معامل متغير واحد، أي أن بنية الكتلة الحيوية يتم اعتبارها في النموذج. ويمكن لهذه البنية أن تكون بسيطة جداً، أو مؤلفة من بضع حجيرات، أو حتى بنية تفصيلية على مستوى الأنزيم الواحد، أو مجموعة من الجزيئات الكبيرة.

يتضح مما سبق وجود عنصر مهم في النّمذجة الحسابية لعملية التخمير، ألا وهو تعريف بُنية النموذج (أو تحديد تعقيد النموذج)، ولهذا الهدف نذكر القاعدة العامة التالية: أبسط ما يمكن، ولكن ليس الأكثر بساطة. ونقصد بهذه القاعدة أن الميكانيكيات الأساسية لا بد من إدراجها، وأن بنية النموذج تعتمد على الهدف المقصود من النّمذجة (انظر الصندوق 2.6). وهكذا إن كان الهدف هو محاكاة وتخمين تركيز الكتلة الحيوية في عمليات التخمير فإن نموذجاً بسيطاً لابنيوياً يكون كافياً (انظر القسم 3.2.6 و4.2.6)، ولكن إذا كان الهدف هو تحليل المنظومة بتفصيل أكثر فلا بد من إدراج بنية أكثر (More structure) في النموذج، في هذه الحالة يتم غالباً توصيف لكلّ عملية في الخلية على حِدَة، مثلاً مسار أيض محدد أو تعبير مورث من محركه.



الشكل 2.6: توضيح التفاعلات المختلفة الشاملة التي تُحوِّل المواد أولية إلى خلايا فعالة.



الشكل 3.6 : أنماط مختلفة من درجات تعقيد النماذج، يزداد التعقيد من الزاوية العليا يساراً إلى الزاوية السفلى يميناً. فعندما يتم التصنيف ووضع البنية على مستوى الخلايا، يأخذ النموذج بالحسبان التفاعلات والأحداث داخل الخلية، ونقوم بتصنيف ووضع بنية الكتلة الحيوية في عاملين متغيرين أو أكثر. عندما يتم التصنيف ووضع البنية على مستوى مجموعة الخلايا (population)، فيجب أخذ العزل والانفصال (segregation)بعين الاعتبار، أي أن الخلايا ضمن المجموعة ليست متطابقة.

الإطار 2.6 : درجة تعقيد النموذج Model complexity

توضيح بسيط لدرجة تعقيد نموذج ما من خلال توصيف كمي للإشباع الجزئي (Fractional saturation Y) لبروتين معين بوجود تركيز الجزيء المرتبط (Ligand) بتركيز Cl. يمكن توصيف هذا إما بواسطة معادلة "هيل" (Hill equation):

المعادلة (1) $y = \frac{c_l^h}{c_l^h + K}$ حيث يكون العامل K و h ذوي قيمة مبنية على التجربة (empirical)،

وإما بواسطة معادلة "مونود" Monod:

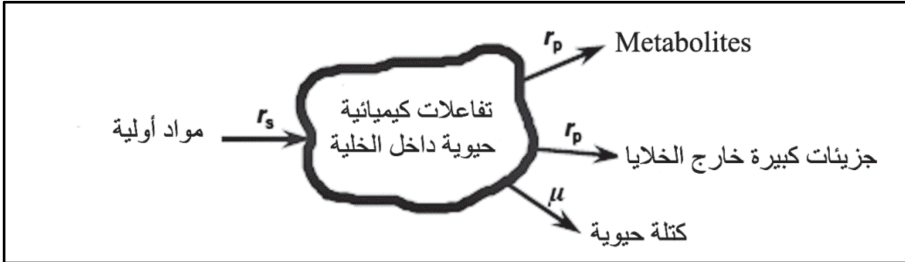
المعادلة (2) $y = \frac{\left[La\left(1+\frac{ac_l}{K_R}\right)^3 + \left(1+\frac{c_l}{K_R}\right)^3\right]\frac{c_l}{K_R}}{L\left(1+\frac{ac_l}{K_R}\right)^4 + \left(1+\frac{c_l}{K_R}\right)^4}$ حيث يكون L و a و K_R معايير.

تعالج كلتا المعادلتين نفس المسألة المخبرية التجريبية، ولكن في حين أن المعادلة (1) مبنية على التجربة كلياً (empirical) حيث يُعتمد معياران h و K بقيمة مناسبة، فإن المعادلة (2) تشتق من فرضية للميكانيكية، ولذلك يكون للمعايير تفسير أو معنى فيزيائي مباشر. فإذا كان الهدف من النمذجة هو فهم الميكانيكية المسؤولة عن عملية ما، فإن المعادلة (1) لا يمكن أن تُطبق لأن المعايير الحركية (kinetic parameters) مبنية كلياً على التجربة ولا تعطي فكرة عن ارتباط الــligand بالبروتين. في هذه الحالة يجب تطبيق المعادلة (2) لأن تخمين معايير حركية يؤمن للباحث معلومات قيمة حول المنظومة ويمكن تحليل وتفسير تلك المعايير بشكل مباشر. أما في الحالة الأخرى، إذ يكون الهدف من النمذجة هو تخمين ومحاكاة ارتباط الــligand بالبروتين فإن المعادلة (1) تكون صالحة كما المعادلة (2)، حتى يمكن تفضيل المعادلة (1) لبساطة البنية وقلة العوامل الداخلة، كما تتناسب بشكل أفضل من المعادلة (2) مع بيانات التجارب المخبرية. لذلك لا بد من معرفة الهدف من تمرين النمذجة (modeling exercise) كي يتم اختيار النموذج الأمثل.

2.2.6 تعريف مُعاملات النسب والمحصول

Definitions of rates and yield coefficients

قبل البدء بوصف نماذج مختلفة لابنيوية لا بد من تعريف بعض المصطلحات. يبين الشكل 4.6 نظرة عامة شاملة لتحويل مواد أولية إلى نواتج أيض ومركبات الكتلة حيوية (كامل الكتلة الحيوية). يتم تحديد معدل سرعة استهلاك المواد الأولية أثناء عمليات التخمير من خلال قياس تركيزها في الوسط الغذائي. كذلك الأمر بالنسبة إلى تحديد معدل سرعة إنتاج مواد الأيض والكتلة الحيوية، فيتم تحديدها من خلال قياس تركيزها في الوسط الغذائي. لهذا يمكن تحديد تدفق أو سرعة جريان المواد الداخلة في مجموعة الخلايا وتلك الخارجة منها.



الشكل 4.6: تصوُّر عام للنمو الخلوي وتكوين المنتجات. يتم تحويل المواد الأولية داخل الخلية، من خلال عدد كبير من التفاعلات الكيميائية الحيوية، إلى مركبات أيض كالكحول أو حمض اللبن lactate أو البنيسيلين (ومواد أيض ثانوية)، بالإضافة إلى جزيئات كبيرة وأنزيمات مفرزة لخارج الخلية، أو بروتينات غريبة، أو سكريات معقدة، بالإضافة إلى مكونات الكتلة الحيوية كالبروتينات الخلوية، والدهون، والـــRNA، والـــDNA، والكربوهيدرات.

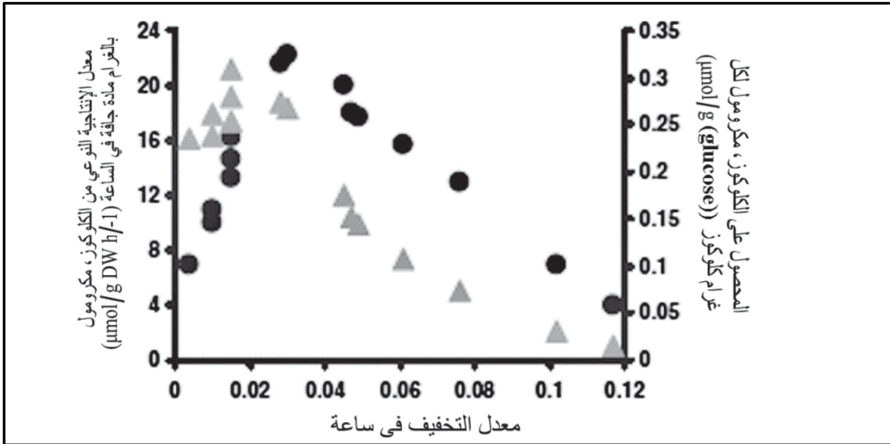
إن التدفق الداخل (Inflow) من المادة الأولية يسمَّى عادة "نسبة أو معدل امتصاص المادة الأولية" (Substrate uptake rate) والتدفق الخارج (Outflow) من منتجات الأيض يسمَّى "نسبة أو معدل تكون المنتوج". ومن خلال القياسات المباشرة للتراكيز نحصل على ما يسمّى بالمعدل الحجمي (Volumetric rate)، ذي وحدة قياس بالغرام باللتر في الساعة (g /L h) أو مول باللتر في الساعة (moles (L h) ومن الطبيعي تسوية مقياس (Normalize) المعدلات بالنسبة إلى قيمة الكتلة الحيوية الجافة (DW=dry weight) كي نحصل على

المعدل النوعي (Specific rates) التي يُرمز إليها بـــr_i ذات وحدة قياس بالغرام لكل غرام مادة جافة في الساعة ($g\ (g\ DW\ h)^{-1}$) أو مول لكل غرام مادة جافة في الساعة ($moles\ /g\ DW\ h)^{-1}$). ويحل محل الحرف "i" الحرف "s" للمادة أو المواد الأولية ((Substrate(s)) والحرف "p" للمُنتَج (Product). إن معدل النمو النوعي (Specific growth rate) لكامل الكتلة الحيوية هو أيضاً من العوامل المتغيرة يُرمز إليها بـــμ ووحدة قياسها غرام من المادة الجافة لكل غرام من المادة الجافة في الساعة ((g DW (g DW/ h))، أي بالساعة (h^{-1}) (بعد الاختزال). كذلك فإن معدل النمو النوعي له علاقة مباشرة بوقت تضاعف (Doubling time) الكتلة الحيوية، الذي يُرمز إليه بـــ$t_d(h)$ ضمن المعادلة التالية:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad 1.6$$

يساوي وقت التضاعف t_d وقت أو عمر الجيل (Generation time) الواحد للخلية، أي الفترة الزمنية لدورة حياة الكائن أحادي الخلية (لتتحول من خلية واحدة إلى اثنتين). وهو معيار يستعمل دائماً من قبل العلماء لتقييم أو تحديد مقدار كمّي للنمو الخلوي.

إن المعدلات النوعية المذكورة – سرعة التدفق من وإلى الخلية – هي عوامل مهمة في التصميم لأنها مرتبطة بمستوى الإنتاجية (Productivity) في الخلية. لذا فإن مستوى الإنتاجية النوعي لمادة أيض محددة يدل مباشرة على معدل تصنيعها من قِبل الخلية. ونحصل بالتالي على مستوى الإنتاجية الحجمية (Volumetric productivity) من خلال عملية ضرب المعدل النوعي بتركيز الكتلة الحيوية في المفاعل الحيوي. يقصد بالإنتاجية الحجمية معدل تكوُّن الكتلة الحيوية لكل الخلايا (Population) في حجم المفاعل كله. في النماذج البسيطة الحركية يتم تحديد المعدل النوعي بالنسبة إلى عوامل متغيرة في المنظومة، مثلاً تراكيز المواد الأولية. وفي النماذج الأكثر تعقيداً حيث يتم تحديد معدلات التفاعلات داخل الخلية بالنسبة إلى العوامل المتغيرة في النظام، يُعتبر معدل امتصاص المواد الأولية ومعدل تكوُّن المُنتج بالنسبة إلى معدل التفاعلات داخل الخلية.



هناك الشكل 5.6: إنتاجية البنيسيلين النوعية (specific productivity) (■) ومحصول البنيسيلين (●) (yield) ، باستعمال الكلوكوز على معدلات نمو نوعي مختلفة (مساوية لمعدل التخفيف بالكيموستات، انظر المقطع 3.3.6).

صنف مهم آخر من معايير التصميم هو مُعامل مستوى المحصول (Yield coefficient) الذي يُحدد كمية المادة الأولية التي تحولت إلى كتلة حيوية ومنتجات أيض. يتم حساب مُعامل مستوى المحصول بعملية حساب لنسبة المعدلات النوعية (مثلاً حساب مستوى محصول الكتلة الحيوية على المادة الأولية):

$$Y_{sx} = \frac{\mu}{r_s} \quad 2.6$$

وبنفس الطريقة حساب مستوى محصول مُنتج مواد الأيض على المادة الأولية

$$Y_{sp} = \frac{r_p}{r_s} \quad 3.6$$

يحدد مُعامل المحصول بكيفية توزيع ذرات الكربون الموجودة في المادة الأولية بين مسارات التفاعلات الحيوية الحاصلة داخل الخلية، والنواتج النهائية من كافة عمليات الهدم والبناء الحاصلة. لذلك، تُعتبر هذه العوامل كمعايير شاملة لكافة "تدفقات الأيض" (Metabolic fluxes)، وهو مفهوم أساسي في الدراسات الفسلجية الحديثة حيث تُستعمل أدوات وطرق مهمة لقياس كميات المركبات داخل الخلية وقياس تدفق الأيض. خلال عملية إنتاج مواد ذات قيمة متدنية (low value-added)، مثلاً

الإيثانول، أو مضادات حيوية وأحماض أمينية بكمية كبيرة (Bulk)، فإنه من الضروري أن نحصل على أعلى مستوى من المحصول بالنسبة إلى المادة الأولية، هنا يكون الهدف أن نوجه أكثر ما يمكن من ذرات الكربون في المسار الذي يعطي هذه المادة المطلوبة وتقليل جريانه في مسارات أخرى (منها مسار إنتاج الكتلة الحيوية).

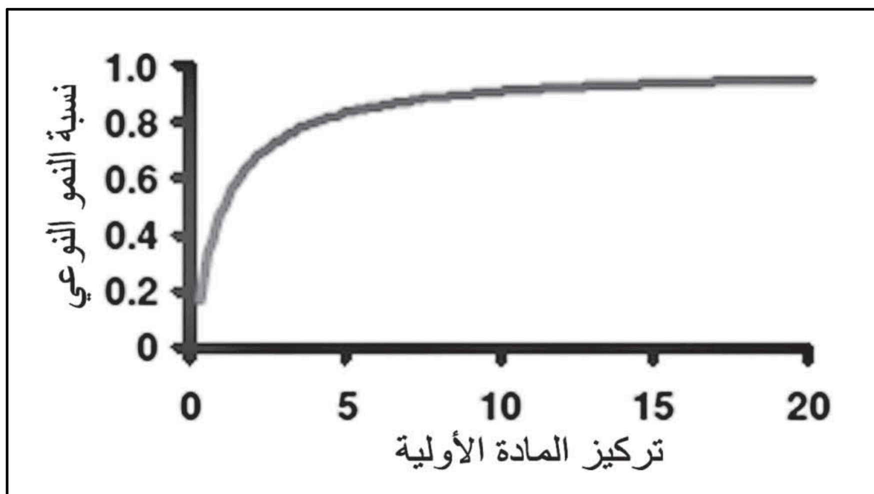
ففي العمليات الهوائية، يُستعمل إنتاج ثاني أكسيد الكربون انطلاقاً من الأكسجين كمعيار لتوصيف ولتمييز نشاط الأيض في الخلية. يُسمى مُعامل المحصول هذا بحاصل التنفس (Respiratory Quotient أو RQ). فعندما يكون التنفس كاملاً تكون قيمة الحاصل قريبة من 1، وتنحرف القيمة عن العدد 1 في حال تكوُّن نواتج أيض (انظر المقطع 4.2.6) .

تُكتب مُعاملات المحصول مع حرفين رمزين (Double index) وذلك لتمييز اتجاه التحول، أي مستوى المحصول انطلاقاً من المادة الأولية الى الكتلة الحيوية (من s إلى x) ويرمز إليه sx. ومع تعريفات مُعاملات المحصول تصبح المعادلة التالية واضحة:

$$Y_{ij} = \frac{1}{Y_{ji}} \qquad 4.6$$

وعليه فمُعامل المحصول Y_{xs} يحدد كمية المواد الأولية المستعملة في تكوين وحدة واحدة من الكتلة الحيوية، ومُعامل المحصول Y_{xp} يحدد كتلة المنتوج المكوّن لكل وحدة من الكتلة الحيوية التي تكونت. يُعتبر هذان المعياران المهمان (مُعامل المحصول ومعدل النمو النوعي) من أهم معايير التصميم لتوفير الظرف الأمثل والعوامل الأفضل (Optimazation) لعمليات التخمير ولكن، من النادر أن نستطيع ضبط المعيارين في نفس الوقت للحصول على الظروف المثلى. وهذا ما يوضحه الشكل 5.6 حيث يُبين مستوى الإنتاجية النوعي للبنيسيلين، وكمية محصول البنيسيلين انطلاقاً من الكلوكوز، وذلك على معدلات نمو نوعي مختلفة. يُبين الخط البياني بوضوح بأننا نحصل على كمية المحصول المثلى عندما يكون

معدل النمو النوعي قليلاً مقارنة بالمعدل النوعي. وعليه فلا بد من تقدير أهمية هذين المعيارين عند ضبط كامل العمليات للحصول على أفضل النتائج.



الشكل 6.6: معدل النمو النوعي بالنسبة إلى تركيز المادة الأولية المُحدِّدة (limiting) لسرعة النمو بحسب تطبيق نموذج مونود .(Monod model) تمت تسوية (normalized) كلا المعيارين إلى الرقم واحد أي أن .1= ks = : μ_{max}

3.2.6 نماذج الصندوق الأسود Black box models

إن أبسط عرض حسابي (Mathematical) لنمو الخلية هو ما يسمى نموذج الصندوق الأسود حيث يتم جمع كل التفاعلات الخلوية في تفاعل وحيد شامل. ويعني ذلك أن محصول الكتلة الحيوية من المواد الأولية هو ذو قيمة ثابت، وكذلك الأمر بالنسبة إلى محصول باقي المركبات المُستهلكة أو المُنتجة في الخلية. وعليه فإنه يُمكن تحديد معدل امتصاص المادة الأولية بالنسبة إلى معدل النمو النوعي للكتلة الحيوية، وذلك بإعادة كتابة المعادلة 2.6 بالشكل التالي:

$$r_s = Y_{xs}\mu \qquad 5.6$$

أما بالنسبة إلى معدل الامتصاص النوعي للمواد الأولية الأخرى كالأكسيجين مثلاً، ومعدل تكوين نواتج أيض فستكون مرتبطة بشكل تناسبي

(Proportional) مع معدل النمو النوعي. في نموذج الصندوق الأسود، تتلخص الحركية بتوصيف معدل النمو النوعي بالنسبة إلى المتغيرات في هذه المنظومة. ففي أبسط توصيف للنموذج يُفترض وجود مادة أولية واحدة مُحدِّدة للسرعة (Limiting)، هو المصدر الكربون (وفي الغالب يكون الكلوكوز)، وعليه فمعدل النمو النوعي يُحدَّد بالنسبة إلى تركيز هذه المادة الأولية فقط.

هناك ملاحظة عامة بالنسبة إلى النمو الخلوي على مادة أولية واحدة مُحدِّدة للسرعة، وهي أنه عندما يكون تركيز المادة الأولية (c_s) متدنياً يكون معدل النمو النوعي (μ) متناسباً (Proportional) مع c_s، ولكن بالنسبة إلى القيم المرتفعة هناك حد أقصى لــمعدل النمو النوعي μ. هذا التوصيف اللفظي (Verbal) يمكن وصفه بعدة نماذج حسابية مختلفة، ولكن الأكثر تطبيقاً واستعمالاً هو نموذج مونود (Monod) والذي يقول:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_s}{c_s + K_s} \qquad 6.6$$

حيث ترمز μ_{max} للحد الأقصى لمعدل نمو النوعي للخلايا والــK_s تعادل رقمياً تركيز المادة الأولية الذي يكون عليه معدل النمو النوعي مساوياً لنصف قيمة الحد الأقصى أي $0.5\mu_{max}$. باستعمال نموذج "مونود"، تبين المعادلة 6.6 تأثير تركيز المادة الأولية في معدل النمو النوعي. بالنسبة إلى المعيار K_s فهو يعتبر أحياناً التآلف (Affinity) بين الخلية والمادة الأولية. وبما أن امتصاص المادة الأولية يتدخل غالباً في تنظيم استهلاكه فإن قيمة K_s هي قريبة من مجال قيمة K_m. ولكن K_s تبقى هي المعيار الكمي أو الشامل لكل التفاعلات التي تُحوِّل المادة الأولية إلى كتلة حيوية، وهي بالتالي تجريبية (Empirical) بالكامل، وليس لها أي معنى فيزيائي. يبين الجدول 1.6 ملخصاً عن قيمة K_s لمنظومات كائنات جرثومية مختلفة.

الجدول 1.6: قيم K_s النموذجية لكائنات جرثومية مختلفة تنمو على أنواع سكر مختلفة		
Species النوع	Substrate المادة الأولية	$(mg\ l^{-1})$ Ks ملغ باللتر
Aerobacter aerogenes	كلوكوز	8
Asergillus oryzae	كلوكوز	5
E. coli	كلوكوز	4
Klebsiella aerogenes	كلوكوز	9
	كليسيرول	9
Klebsiella oxytoca	كلوكوز	10
	Arabinose أرابينوز	50
	فركتوز	10
Penicillium chrysogenum	كلوكوز	4
Saccharomyces cervisiae	كلوكوز	180

الجدول 2.6: جمع وتصنيف نماذج حركية (kinetic) غير بنيوية (unstructured)	
اسم النموذج	Kinetic expression مقادير جبرية حركية
تيسير (Tessier)	$\mu = \mu_{max}\left(1 - e^{-c_s/K_s}\right)$
موسر (Moser)	$\mu = \mu_{max}\dfrac{c_s^n}{c_s^n + K_s}$
كونتويس (Contois)	$\mu = \mu_{max}\dfrac{c_s}{c_s + K_s x}$
بلاكمان (Blackman)	$\mu = \begin{cases} \mu_{max}\dfrac{c_s}{2K_s}; & c_s \le 2K_s \\ \mu_{max}; & c_s \ge 2K_s \end{cases}$
قانون المنطق اللوجستي (Logistic law)	$\mu = \mu_{max}\left(1 - \dfrac{x}{K_x}\right)$

إن نموذج مونود (Monod) ليس المرشح الوحيد من بين المقادير الجبرية الحركية (Kinetic expressions) لتوصيف معدل النمو النوعي في نموذج الصندوق الأسود. فهناك عدد من المقادير الجبرية الحركية التي يمكن استخدامها، يبين الجدول 2.6 أكثرها استعمالاً. ففي نموذج كونتويس (Contois) تم إدراج تركيز الكتلة الحيوية (x) كعامل مؤثر، أي أنه عندما يكون تركيز كتلة حيوية مرتفعاً يسبب تثبيط النمو الخلوي. ولا نعني بذلك أن الكتلة الحيوية بذاتها هي التي تقوم بتثبيط النمو مباشرة، وإنما يكون التأثير غير مباشر كنتيجة تصنيع مركبات مُثبِّطة من قِبَل الكتلة الحيوية، أو أن الكتلة الحيوية عالية التركيز تُسبب لزوجة في الوسط الغذائي مما يؤدي إلى صعوبة في حركة وانتقال المواد. إن هذه المقادير الجبرية المختلفة تبين بوضوح الطبيعة التجريبية (Empirical) للنماذج الحركية، لذلك تُعتَبر مناقشة مدى أفضلية نموذج على آخر غير مجدية، وذلك ببساطة لأنها تُصاغ كلها بناء على المعطيات (Data) المتوفرة. علينا إذاً اختيار النموذج الذي يعطي أفضل توصيف للمنظومة قيد الدراسة.

كل المقادير الجبرية التي تم عرضها مبنية على فرضية أن هناك فقط مادة أولية مُحدِّدة واحدة (Limiting substrate). ولكن غالباً ما تكون هناك أكثر من مادة يكون تركيزها مؤثراً في معدل النمو النوعي. في هذه الحالة يمكن أن تنشأ علاقات معقدة تصعب نَمذَجَتها بواسطة نماذج لابنيوية، إلا إذا تم قبول عدد من المعايير المعدَّلة (Adjustable parameter). ولقد تم اقتراح نماذج لابنيوية عديدة ذات معايير متعددة مختلفة (Different multi parameters) للنمو على مواد أولية عديدة، وفي هذه الحالة يجب التمييز بين ما إذا كانت المادة الأولية الثانية تسبب تحفيزاً للنمو أو تثبيطاً كونها بكمية محدودة. هناك مقدار جبري حركي عام والذي يُفسِّر النوعين من المادة الأولية:

$$\mu = \left(1 + \sum_{i} \frac{c_{s_i,e}}{c_{s_i,e} + K_{e,i}}\right) \prod_{j} \frac{\mu_{max,j} c_{s,j}}{c_{s,j} + K_{s,j}} \qquad 7.6$$

حيث تُمثِّل c_{se} تركيز المادة الأولية المُحفِّزة للنمو و c_s تركيز المادة الأولية الضرورية للنمو. وبوجود المادة المُحفِّزة سيزداد معدل النمو النوعي بينما تكون

المواد الأولية الضرورية أساسية لكي يحصل النمو في الأصل. وفي حالة خاصة يمكن تحويل المعادلة 7.6 إلى معادلة تأخذ بالحسبان وجود مادتين أوليتين ضروريتين للنمو كما يلي:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1}\mu_{\max,2}c_{s,1}c_{s,2}}{(c_{s,1}+K_1)(c_{s,2}+K_s)} \quad 8.6$$

وإذا كان تركيز المادتين الأوليتين بحيث يسمح بمعدل نمو نوعي بنسبة 90% من معدل النمو الأقصى، أي أن $C_{s,i}= 0.9\ K_i$، عندها يكون معدل النمو الكلي (total rate of growth) 81 % من الحد الأقصى الممكن. هذا غير مقبول ولقد تم اقتراح بدائل للمعادلة 8.6 إحداها كالتالي:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \min\left(\frac{c_{s,1}}{c_{s,1}+K_1}, \frac{c_{s,2}}{c_{s,2}+K_2}\right) \quad 9.6$$

عندما يكون النمو على مادتين أوليتين أو أكثر، مع إمكانية أن تقوم إحداها مكان الأخرى، مثلاً كلوكوز ولاكتوز، فإن أيّاً من النماذج اللابنيوية لا يمكن استعمالها للتوصيف. لنأخذ مثال البكتيريا *E. coli* التي تتغذى على كلوكوز ولاكتوز. الكلوكوز هو المفضل وسيتم استهلاكه أولاً، ولا يبدأ استهلاك اللاكتوز إلا عندما يتم استهلاك كامل الكلوكوز. تحتاج البكتيريا إلى أي واحد من هذين النوعين من السكر لتعيش، لكن بوجود الكلوكوز ليس هناك أي تأثير إيجابي للاكتوز في النمو. ولتوصيف هذه الحالة من النمو على مصدرين المسماة Diauxic لا بد من تطبيق نموذج بنيوي (Structured model)، وعادة يُنصح الأخذ بالحسبان لمادة أولية واحدة مُحدِّدة (limiting substrate) في نماذج الصندوق الأسود فقط.

في بعض الأحيان يحصل انخفاض في النمو (تثبيط) بسبب تركيز عالٍ للمادة الأولية المُحدِّدة (Limiting substrate) أو بسبب نواتج أيض. ومن أجل توصيف هذه الجوانب فإننا نقوم بإضافة عوامل أخرى على نموذج مونود (Monod) الحركي. فبالنسبة إلى عملية التثبيط بالتركيز العالي للمادة الأولية المُحدِّدة للنمو (Limiting substrate) نحصل على ما يلي:

$$\mu = \mu_{\max}\frac{c_s}{c_s{}^2/K_i + c_s + K_s} \quad 10.6$$

أما المعادلة التي تمثل التثبيط بنواتج الأيض فهي كما يلي :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_s}{c_s + K_s} \frac{1}{1 + p/K_i} \qquad 11.6$$

تعتبر المعادلتان 10.6 و 11.6 مفيدتين كي نأخذ بعين الاعتبار التثبيط بالمادة الأولية أو بالمُنتَج في نموذج بسيط. يجب التعامل بحذر مع استطالة (Extension) نموذج "مونود" بعوامل إضافية، لأن النتيجة قد تكون عدداً كبيراً من المعايير، ولكن تلك المعايير (Parameters) ذات قيمة قليلة خارج المجال الذي أُجريت التجربة فيه.

4.2.6 معادلات النسب الخطية Linear rate equations

لقد تم اعتبار جميع مُعاملات المحصول (Yield) ثابتة في نموذج الصندوق الأسود، يعني هذا أننا نعتبر جميع التفاعلات الخلوية كتفاعل واحد شامل وهو تفاعل النمو الخلوي، حيث تتحول المادة الأولية إلى كتلة حيوية. الشرط الضروري لهكذا افتراض هو تساوي تدفق المادة الأولية بشكل مستمر وثابت في كافة المسارات الحيوية في الخلية وفي مختلف ظروف النمو. ولا يكون هذا الافتراض صحيحاً لأن محصول الكتلة الحيوية الناتجة من تحول المادة أولية هو ذو قيمة غير ثابتة. وبهدف توصيف وتفسير هذه الملاحظة (التغيير وعدم الثبات) فقد أدخِل مفهوم "الأيض الداخلي" (Endogenous metabolism) الذي يبين ويحدد استهلاك المواد الأولية للأيض الداخلي واستهلاك المواد الأولية لعملية بناء الكتلة الحيوية، أي أن استهلاك المادة الأولية يتم في تفاعلين مختلفين. وفي تطور موازٍ تم التثبُّت من أن إنتاج البكتيريا لحمض اللبن (Lactic acid) يتم تحت ظروف لا نمو فيها للكائن الحي، هذا ما يتناسب مع افتراض الأيض الداخلي للخلايا. وبينت النتيجة ارتباطاً خطياً (Linear correlation) بين الإنتاج النوعي لحمض اللبن ومعدل النمو النوعي، كما في المعادلة التالية:

$$r_p = a\mu + b \qquad 12.6$$

حيث إن a و b هما ثابتان. وبعد ذلك تم إدخال مفهوم الصيانة (Maintenance) كارتباط خطي بين معدل الامتصاص النوعي للمادة الأولية ومعدل النمو النوعي،

وذلك كي يحل مكان مفهوم التنفس الداخلي (Endogenous respiration)، انظر صندوق 3.6. وان الارتباط الخطي للصيانة يُصبح تمثيله بالمعادلة التالية:

$$r_s = Y_{xs}^{true}\mu + m_s \qquad 13.6$$

حيث يرمز Y_{xs}^{true} إلى مُعامل المحصول الحقيقي (True yield coefficient) و m_s هو مُعامل الصيانة (Maintenance coefficient) الذي يُعبِّر عن كمية المادة الأولية المستهلكة بهدف الصيانة، وعادة ما يكون ذا قيمة ثابتة. مبدئياً، يسبب هذا الأمر شيئاً من التناقض لأنه يعني وجود عملية استهلاك المادة الأولية حين يكون تركيزها يساوي صفراً (c_s=0)، وعليه من الضروري في بعض الحالات تحديد قيمة m_s بالنسبة إلى c_s.

الإطار 3.6: الصيانة Maintenance

إن استهلاك المواد الأولية لأجل صيانة وظائف الخلية هو نتيجة لتفاعلات وعمليات مختلفة تحصل داخل الخلية. أما السمة المشتركة بين كل تلك العمليات فهي استهلاك طاقة "جبس" الحرة (Gibbs free energy عادة تكون الطاقة المستهلكة ATP)، وعدم إنتاج كتلة حيوية جديدة عن هذه التفاعلات. ومن أجل تأمين طاقة "جبس" الحرة لا بد من هدم المادة الأولية واستهلاكها بدون إنتاج كتلة خلوية. وإن أهم ثلاث عمليات صيانة هي:

1- الحفاظ على التدرج (gradient) في تراكيز الشحنات الكهربائية على جانبي الأغشية الحيوية المختلفة داخل الخلية. فعلى جانبي الغلاف السيتوبلازمي وغيره من الأغشية هناك اختلاف كبير في درجات تركيز عناصر مختلفة كالبروتون والأملاح وأيونات أخرى. ينتج من ذلك تدرج كهربائي (electrical gradient) يُعتبر مهماً في العديد من الوظائف الخلوية.

2- دورات غير مجدية: ففي الخلية توجد تفاعلات مزدوجة تتكرر وتستهلك طاقة "جبس". ومثال على ذلك هناك عملية فسفرة الفركتوز-6-فوسفات (fructose 6-phosphate) وتحويله إلى فركتوز ثنائي الفوسفات في موقعي 1 و 6 (fructose 1,6-bisphosphate)، ويستهلك هذا التفاعل ATP ويُسرِّعه أنزيم فوسفوفركتوكاينيز (phosphofructokinase). يلي التفاعل الأول تفاعل التحلل المائي (hydrolysis) للفركتوز ثنائي الفوسفات إلى فركتوز-6-فوسفات بدون إنتاج ATP (الأنزيم المُسرع هو فركتوز-1،6- بيسفوسفاتيز fructose 1,6-bisphosphatase). يُكبح التحليل المائي المذكور بوجود الكلوكوز أي عند تدفق مسار تحليل السكر (glycolytic flux, glycolysis). بالرغم من ذلك فإن هناك تفاعلات تحلل مائي تستمر في دورة غير مجدية.

3- هدم وإعادة إنتاج الجزئيات كبيرة (turnover of macromolecules). هناك عدد من الجزئيات الكبيرة التي تُنتجُ وتُهدم بشكل مستمر. وهذا نوع خاص من حلقات التفاعل الغير المجدية بالنسبة إلى بناء الكتلة الحيوية (والضرورية للخلية) لأن النتيجة النهائية هي استهلاك الطاقة "جبس" بدون إنتاج كتلة حيوية. ومن أكثر الجزئيات الكبيرة أهمية والتي هي في حالة مستمرة من هدم وبناء هي جزئيات RNA الرسول والتي تبقى ثابتة لفترة قصيرة داخل الخلية.

ومع إدخال الارتباط الخطي (Linear correlations)، يُصبح من غير الممكن اعتبار مُعاملات المحصول كثوابت، وعليه فإن محصول الكتلة الحيوية من المادة الأولية يمثل بالمعادلة التالية:

$$Y_{sx} = \frac{\mu}{Y_{xs}^{true}\mu + m_s} \quad 14.6$$

والتي تبين بأن قيمة Y_{sx} تتناقص عندما تكون قيمة معدل النمو النوعي قليلة وحيث يزداد الجزء المستعمل من المادة الأولية في تفاعلات الصيانة في الخلية. ولكن عندما تكون معدلات النمو النوعي مرتفعة، فإن مُعامل المحصول تتقارب قيمتُه من قيمة تبادلي (Reciprocal) الــY_{xs}^{true}. في هذه الحالة يعني ذلك أن استهلاك المواد الأولية لأغراض الصيانة يُصبح قليلاً جداً مقارنة بالكميات المستهلكة من المواد الأولية في بناء الكتلة الحيوية والنمو، وبالتالي يمكن تحويل وتقريب المعادلة 13.6 إلى المعادلة 5.6. وبالرغم من البنية البسيطة (Simple structure) والطبيعة الخطية (Linear) للمعادلة 13.6 فإنها تعتبر منطقية وتنطبق على أصناف كائنات حية مختلفة. يبين الجدول 3.6 قيمة كل من مُعامل المحصول الحقيقي ومُعامل الصيانة لعدة سلالات جرثومية.

إن العلاقة الخطية التي تم التوصل إليها بطريقة تجريبية (Empirically) تُعتبر مفيدة جداً من أجل تحديد الارتباطات المتبادلة لعمليات النمو، خاصة أثناء الزراعة الدائمة المستقرة والمستمرة (Steady-state continuous-cultures) حيث نجد ارتباطات خطية مشابهة للمعادلة 13.6 لمعظم المعدّلات النوعية. إن قوة وصحة هذا النوع من الارتباطات تدل على اعتماده على أساس مبدئي وهو استمرارية عملية استهلاك وتصنيع الــATP، وهما عمليتان مترابطتان في كل الخلايا. لذلك فإن دور المادة الأولية المُنتِجة للطاقة هو إنتاج الــATP الذي يقوم بتوجيه تفاعلات التصنيع الحيوي (Biosynthetic) وتفاعلات البلمرة، وكذلك عمليات الصيانة بناءً على المعادلة التالية:

$$r_{ATP} = Y_{xATP}\mu + m_{ATP} \quad 15.6$$

والتي هي نظير "ارتباط الصيانة الخطي". تُبين المعادلة 15.6 أن كمية الــATP المُنتَج تُوازِن الكمية المستهلكة في النمو والصيانة، وإذا كانت نسبة محصول الــATP على المادة الأولية المُنتِجة للطاقة ثابتة، أي أن r_{ATP} يتناسب (Proportional) مع r_s، فيكون بديهياً استعمال المعادلة 15.6 لاشتقاق الارتباط الخطي في المعادلة 13.6. لاحظ أن الــY_{xATP} في المعادلة 15.6 هي ليست مُعامل محصول حقيقي وإنما فقط مقياس أو معيار.

الجدول 3.6: معامل المحصول الحقيقي (true yield) ومعامل الصيانة لكائنات مجهرية مختلفة نامية على كلوكوز أو كليسرول.

الكائن	المادة الأولية	Y_{xs}^{true} $(g(gDW)^{-1})$	m_s $(g(gDWh)^{-1})$
Aspergillus awamori	كلوكوز	1.92	0.016
Aspergillus nidulans		1.67	0.020
Aspergillus niger			
Aspergillus oryzae			
Candida utilis		2	0.031
Escherichia coli		2.27	0.057
Klebsiella aerogenes		2.27	0.063
Penicillium chrysogenum		2.17	0.021
Saccharomyces cerevisiae		1.85	0.015
Aerobacter aerogenes	كليسيرول	1.79	0.089
Bacillus megatarium		1.67	–
Klebsiella aerogenes		2.13	0.074

5.2.6 تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة

Effect of temperature and pH

تُعتبر درجة الحرارة ودرجة الحموضة في التفاعل في الوسط الغذائي ظروفاً ذات تأثير مباشر في حركية النمو. ويُفضّل الحفاظ على ثبات هذين العاملين المتغيرين على أفضل قيمة (Optimal value) طيلة عملية النمو. ولقد سُمّي هذان المتغيران "معايير الزراعة" (Culture parameters) وذلك لتميزهما من بقية المتغيرات الأخرى مثل تركيز المواد المتفاعلة، وسرعة التحريك للمزج، ومعدل

توفُّر الأكسيجين...إلخ، والتي يمكن أن تتغير في مراحل الإنتاج المختلفة، بين بداية وحتى نهاية الزرع. يختلف تأثير الحرارة والحموضة على العمليات الحيوية المتنوعة داخل الخلية؛ وبما أن عملية النمو هي نتيجة لكل تلك العمليات الحيوية، لذلك فإن تأثير "معايير الزراعة" (الحرارة والحموضة) في مجمل التفاعلات في المنظومة غاية في التعقيد.

إن تأثير الحرارة في معدل النمو النوعي الأقصى (Maximum specific growth rate) لكائن مجهري يتماهى مع التأثير في نشاط الأنزيم، حيث يزداد نشاط الأنزيم بزيادة الحرارة حتى يصل إلى حد أقصى، ثم يبدأ بالتناقص سريعاً مع بدء مسخ (Denaturation) البروتينات. وعلى درجات الحرارة الأدنى من تلك المؤدية إلى المسخ البروتيني، يكون معدل النمو النوعي الأقصى في ازدياد مماثل لأي ثابت معدل كيميائي طبيعي (Normal chemical rate constant):

$$\mu_{\max} = A \exp\left(-\frac{E_g}{RT}\right) \qquad 16.6$$

حيث إن A هي مقدار ثابت و E_g هي طاقة التنشيط لعمليات النمو.

وبافتراض أن الحرارة تمسخ (Denature) البروتينات بتفاعل كيميائي منعكس (Reversible) مع تغير بالطاقة الحرة ΔG_d، وأن البروتين الممسوخ غير ناشط، يمكن اقتراح معادلة للمقدار الجبري (Expression) لــ μ_{max} وهي:

$$\mu_{\max} = \frac{A \exp(-E_g/RT)}{1 + B \exp(-\Delta G_d/RT)} \qquad 17.6$$

أما بالنسبة إلى تأثير الحموضة في النشاط الخلوي فهو يعتمد على حساسية كل واحد من الأنزيمات لتغيير الــpH. عادة ما تكون الأنزيمات فعالة في مجال محدد من درجات الحموضة، لذلك فإن نشاط مجمل الأنزيمات لكامل الخلية هي دالة (Function) معقدة مرتبطة بحموضة البيئة المحيطة. كمثال نسوق هنا تأثير الحموضة في نشاط إنزيم واحد، ويُعتبر ممثلاً لنشاط الخلية. نفترض أن الأنزيم يتواجد بثلاثة أشكال، كما يلي:



$$e \leftrightarrow e^- + H^+ \leftrightarrow e^{2-} + 2H^+ \qquad 18.6$$

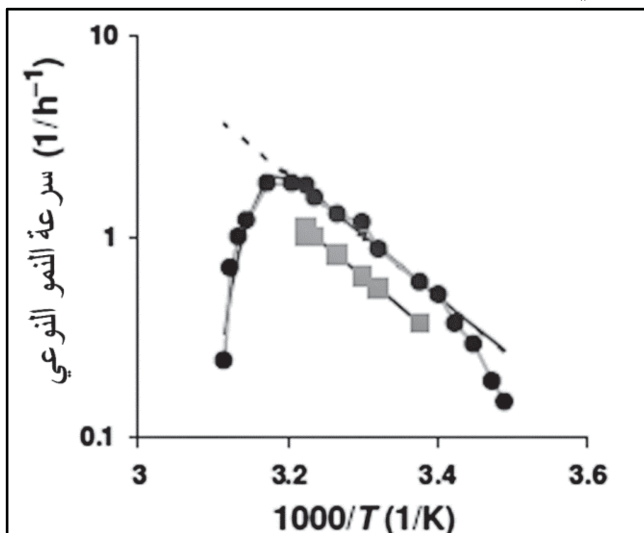
حيث إن e^- تمثل الشكل الناشط للأنزيم، بينما يعُتبر الشكلان الآخران للأنزيم غير ناشطين. K_1 و K_2 هما ثابتا التفكك (Dissociation constants) لكل من الشكلين e و e^-، حسب التسلسل. ويمكن حساب الجزء الناشط من الأنزيم e^- كما يلي:

$$\frac{e^-}{e_{tot}} = \frac{1}{1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+]} \qquad 19.6$$

وتم اعتبار نشاط الأنزيم $k = k_e\, e^-$. إذا تم تحديد نشاط الخلية بنشاط الأنزيم (الذي أُخذ بعين الاعتبار في ما سبق) فإن معدل النمو النوعي الأقصى سيكون:

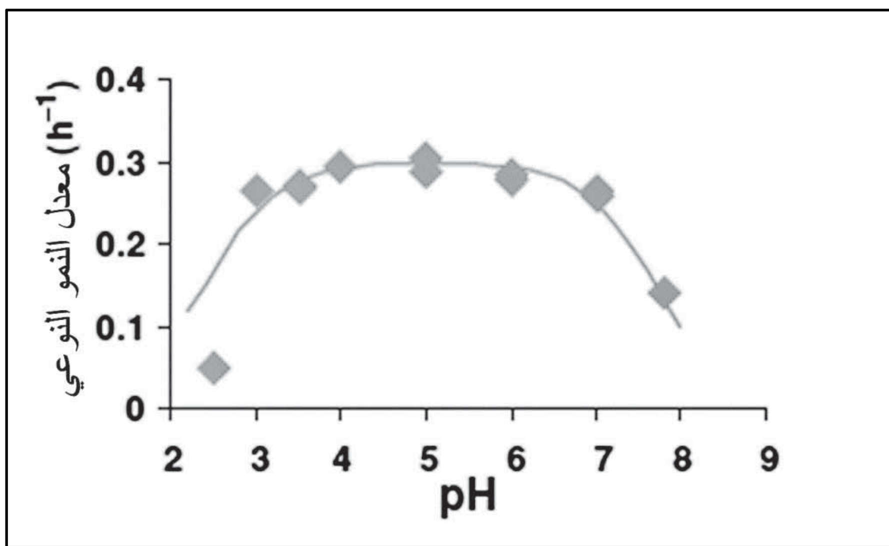
$$\mu_{max} = \frac{ke_{tot}}{1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+]} \qquad 20.6$$

بالرغم من أنه لا يمكن تفسير تأثير الحموضة في نشاط الخلية بهذا النموذج البسيط، فقد تبين أن المعادلة 20.6 تنطبق بنجاح مقبول على عدد من الكائنات المجهرية، ويبين الشكل 8.6 التطبيق المناسب للنموذج على بعض نتائج على الفطر الخيطي *Aspergillus oryzae*.



الشكل 7.6: تأثير درجة الحرارة في الحد أقصى لمعدل النمو النوعي (maximum specific growth rate) كما يظهره رسم "أرهينيوس" البياني (Arrhenius plot)، (والذي يمثل العلاقة المتبادلة (reciprocal) بين درجة الحرارة المطلقة على خط الإحداثي السيني والقيمة اللوغارثمية

لــ μعلى خط الإحداثي الرأسي) عند بكتيريا *E. coli* . (■) يمثل النمو في وسط غني بالكلوكوز. (●) يمثل النمو في وسط فقير بالكلوكوز. الجزء ذو العلاقة الخطية بين 21 وحتى 37.5 درجة مئوية يُمثَّل بالمعادلة 16.6، بينما يُبين الانحناء الحاد والتناقص السريع في قيمة μ عندما تكون الحرارة أكثر من 39 درجة مئوية تأثير مخرج الكسر في المعادلة 17.6.



الشكل 8.6: تأثير درجة الحموضة (pH) على الحد الأقصى لمعدل النمو النوعي للفطر الخيطي Aspergillus oryzae. الخط البياني محاكاة باستعمال المعادلة 20.6 و $K1= 4\times10^{-3}$ و $K2 = 2\times10^{-8}$ وال $ketot=0.3\ h^{-1}$.

3.6 توازنات الكتل في المفاعل الحيوي المثالي

Mass balances for ideal bioreactors

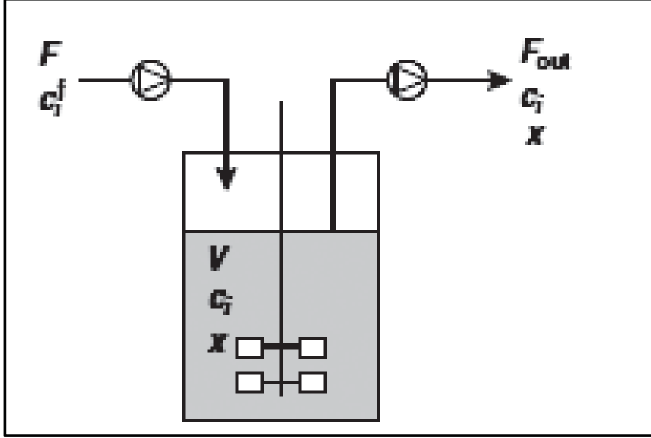
إن الخطوة الأخيرة في نمذجة عمليات التخمير هي دمج نموذج حركي مع نموذج المفاعل الحيوي. عادة ما يتم تمثيل نموذج المفاعل الحيوي باستعمال عدد من توازنات الكتل الديناميكية للمواد الأولية، ولمنتجات الأيض والكتلة الحيوية، التي تُوصِّف تغير التركيز لهذه المتغيرات مع مرور الوقت. ويمكن أن يكون بالمفاعل الحيوي أي نوع من الآلات، بدءاً من أنبوب الاختبار مروراً بقارورة مازجة، وصولاً إلى المفاعل الحيوي ذي التصميم العالي. ويُفترض بالمفاعل أن

تكون المواد الموجودة ممتزجة بشكل كامل أو مثالي (Ideally mixed)، أي أنه لا توجد فروق في تركيز مختلف المركبات بين الأنحاء المتباعدة في الوسط الغذائي. يمكن الحصول على المزج التام من خلال عمليات التهوية والتحريك وذلك في المفاعل الحيوي الصغير الحجم (السعة أقل من 50 لتر)، ومن ضمنها القوارير المخبرية المازجة. أما في المفاعلات الكبيرة الحجم، هناك تدرج (Gradient) في تركيز مختلف المواد عبر المفاعل (بين طرفيه). ولمحاكاة وتخمين عملية التخمير على مستوى صناعي كبير، لا بد من أخذ عامل التدرج في تركيز المواد بعين الاعتبار. (انظر الفصل الثامن). ويتم ذلك عن طريق وضع وتعريف أحجام شاهدة (ضابطة Control volumes) مختلفة في المفاعل الحيوي، ثم وضع توازنات الكتل لكل واحد من تلك الأحجام. إن التحريك (المزج) والتهوية في المفاعل تضمن تبادل المواد بين مختلف الأحجام الشاهدة. وقد تم اقتراح نماذج مختلفة لتوصيف نقص التجانس (Inhomogeneity) في المفاعلات، ولكننا سنذكر فقط الحالة البسيطة حيث يُفترض بالمفاعل أن يكون امتزاجه كلياً. يبين الشكل 9.6 تمثيلاً عاماً للمفاعل.

يمكن تشغيل المفاعل بأنماط (نماذج) ثلاثة:

- نمط الدفعات (Batch): حيث تكون فيه $F_{out}=F = 0$، أي أن الحجم يكون ثابتاً.
- نمط المستمر (Continuous) حيث إن $F_{out}=F$ وقيمتها أكبر من صفر، أي أن الحجم ثابت.
- نمط دفعات–إطعام (Fed-batch) أو نصف الدفعات (Semi-batch) حيث تكون قيمة F أكبر من صفر و $F_{out}= 0$. أي أن الحجم في تزايد.

فيما يلي سيتم تفصيل هذه الأنماط ودراستها، ويلخص الجدول 4.6 المحاسن والمساوئ لهذه الأنواع الثلاثة. يمكن اشتقاق توازنات الكتل لكل الأنماط المختلفة من توازنات الكتل العامة، وسنبدأ بدراسة التوازنات العامة.



الشكل 9.6: عرض عام مبسط لمفاعل حيوي تتم فيه إضافة الوسط الغذائي الطازج والمعقم بمقدار جريان أو تدفق (flow rate) F ذي وحدة قياس باللتر بالساعة ($l\ h^{-1}$) وإزالة الوسط المستنفد بمقدار جريان أو تدفق F_{out} ذي وحدة قياس باللتر بالساعة ($l\ h^{-1}$). ويرمز C_i^f إلى تركيز المركب ذي الترتيب الرقمي "i" (نمطياً تكون المادة الأولية) في الوسط الغذائي الداخل، وكذلك يرمز C_i إلى تركيز المركب ذي الترتيب الرقمي "i" في الوسط الغذائي المستنفد. ترمز V إلى حجم المفاعل باللتر والمفترض بأن يكون مثالياً نتيجة المزج الكامل بحيث يصبح تركيز كل مركب في الوسط الغذائي المستنفد مطابقاً لتركيزه في المفاعل الحيوي. ترمز x إلى تركيز الكتلة الحيوية في المفاعل الحيوي.

1.3.6 معادلات توازن الكتل العام General mass balance equations

إن الأساس في عملية اشتقاق توازنات الكتل الديناميكية العامة هو معادلة توازن الكتل التي تنص على:

التراكم (Accumulation) = معدل التكوين الصافي (Net formation rate) + التدفق الداخل (Flow in) – التدفق الخارج (flow out)

$$\text{Accumulation} = \text{Net formation rate} + \text{Flow} - \text{Flow out} \qquad 21.6$$

ونعني بمصطلح التراكم (Accumulation) معدل تحويل المركب في المفاعل، مثلاً معدل ازدياد تركيز الكتلة الحيوية في المفاعل الحيوي خلال عملية التخمير بنمط الدفعات (Batch). بالنسبة إلى المواد الأولية المتعددة، فإن المصطلح "مقدار التكوين الصافي" (Net formation rate) لمنتجات الأيض

والكتلة الحيوية، يُعطى من قِبَل معدل التكوين لهذه المتغيرات (وقيمها تكون إيجابية دائماً). أما بالنسبة إلى مادة أولية واحدة فستُعطى من قِبَل معدل امتصاص أو استهلاك المادة الأولية، وقيمتها تكون سلبية. أما مصطلح (Flow in) أو التدفق الداخل، فهو يمثل تدفق المركبات المضافة إلى المفاعل الحيوي. والتدفق الخارج (Flow out) يمثل تدفق المواد الخارجة من المفاعل. بالنسبة إلى المادة الأولية ذات الترتيب الرقمي "i" المضافة إلى المفاعل الحيوي أثناء عملية الإطعام (Feed) والمستهلكة من قبل الخلايا الموجودة في المفاعل، فإن توازن الكتل يكون كما يلي:

$$\frac{d(c_{s,i}V)}{dt} = -r_{s,i}xV + F\,c_{s,i}^{f} - F_{out}c_{s,i} \qquad 22.6$$

حيث ترمز r_i إلى المعدل النوعي لامتصاص المادة الأولية وتقاس بالمول لكل غرام من المادة الجافة في الساعة (Moles g DW/h)، و ترمز $C_{s,i}$ إلى التركيز في المفاعل الحيوي والذي من المفترض أن تكون مساوية للتركيز في مخرج (Outlet) المفاعل، ويقاس بالمول باللتر أو غرام باللتر (g/L) أو (moles/L). أما $C^{f}_{s.i}$ فهي تمثل التركيز في الإطعام (Concentration in the feed) ووحدة قياسها بالمول باللتر أو غرام باللتر (moles /L, g/L)، و ترمز x إلى تركيز الكتلة الحيوية في المفاعل الحيوي ووحدة قياسها بالغرام من المادة الجافة في الساعة (g DW/L). ويُعتبر القسم الأول في المعادلة 22.6 هو المقدار الجبري للتراكم. أما القسم الثاني فهو استهلاك المادة الأولية (أو التكون الصافي)، أما الجزء الثالث فيمثل كل ما يدخل المفاعل (Inlet)، وأخيراً الاصطلاح الرابع يمثل كل ما يخرج من المفاعل (Outlet). وعليه يعاد ترتيب المعادلة 22.6 فتصبح كما يلي:

$$\frac{dc_{s,i}}{dt} = -r_{s,i}x + \frac{F}{V}c_{s,i}^{f} - \left(\frac{F_{out}}{V} + \frac{1}{V}\frac{dV}{dt}\right)c_{s,i} \qquad 23.6$$

بالنسبة إلى المفاعل من نمط دفعات–إطعام (fed - batch) نحصل على:

$$F = \frac{dV}{dt} \qquad 24.6$$

و $F_{out} = 0$ يصبح الجزء الظاهر بين القوسين مساويًا لما يسمّى بمعدل التخفيف حسب المعادلة التالية:

$$D = \frac{F}{V} \tag{25.6}$$

بالنسبة إلى نمطي المفاعل المستمر والدفعات (Continous and batch) يكون الحجم ثابتاً، أي أن $dv/dt = 0$ وأن $F_{out} = F$ ، وبالنسبة إلى هذين النمطين من المفاعل الحيوي أيضاً، يصبح الجزء الظاهر بين القوسين مساوياً لمعدل التخفيف. فالمعادلة 23.6 تختصر إلى معادلة توازن الكتل 26.6 في أي نوع من عمليات التشغيل.

$$\frac{dc_{s,i}}{dt} = -r_{s,i}x + D\left(c^{f}_{s,i} - c_{s,i}\right) \tag{26.6}$$

يتم اشتقاق توازنات الكتل الديناميكية لمنتجات الأيض بشكل مشابه لتلك التابعة للمواد الأولية وتأخذ الشكل التالي:

$$\frac{dc_{p,i}}{dt} = r_{p,i}x + D\left(c^{f}_{s,i} - c_{s,i}\right) \tag{27.6}$$

حيث يُعبِّر الجزء الأول من الجهة اليمنى إلى معدل التكوُّن الحجمي (Volumetric formation rate) لمنتَج الأيض ذي الترتيب الرقمي "i". وعادة لا يوجد نواتج أيض في مادة الغذاء المعقمة (Sterile feed) المضافة إلى المفاعل الحيوي، وعليه ستكون $C^{f}_{p,i} = 0$. يكون توازن الكتل في مادة الغذاء المعقم لمجمل الكتلة الحيوية كما يلي:

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu xV - F_{out}x \tag{28.6}$$

التي يمكن أن تكتب من جديد كالآتي (كما في حالة توازن المواد الأولية):

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \tag{29.6}$$

الجدول 4.6: الإيجابيات والسلبيات لأساليب عمل مختلفة في المفاعلات الحيوي		
المفاعل	الايجابيات	السلبيات
الدفعات batch	-متعدد الاستعمالات مع العديد من العمليات -احتمال تلوث قليل -امكانية التحول الكامل للمواد الأولية	-تكلفة تشغيل عالية -وقت ضائع طويل نتيجة التنظيف والتعقيم بعد كل عملية تخمير.
المستمر continuous	-كفاءة عالية لقدرة المفاعل. -مستوى إنتاجية عالٍ ويمكن أن يدوم لوقت طويل -عملية الأتمتة بسيطة -ثبات نوعية المُنتَج	-احتمال تلوث -احتمال ظهور مستويات قليلة من الطفرات أثناء عمليات التشغيل الطويلة - غير مرنة إذ لا يمكن أن تُستعمل لعمليات مختلفة بدون تبديل قطع بأخرى مناسبة. -يجب ضبط عملية المعالجة بعد المفاعل كي تتناسب مع التفق أو الجريان من المفاعل، أو استعمال وعاء تخزين.
دفعات إطعام fed-batch	-يسمح بالعمل في ظروف تشغيل منضبطة عليها بشكل دقيق من خلال ضبط إضافة المواد الغذائية. -يسمح بنمو الخلايا بكثافة عالية مما يؤدي إلى تراكيز عالية في النهاية	السلبيات مشابهة لما ذكر مع المفاعلات السابقة (الدفعات والمستمر) ولكن بدرجة أقل.

2.3.6 مفاعل بنمط الدفعات The batch reactor

هذا النوع من المفاعلات هو النمط التقليدي البسيط الأكثر استعمالاً في التجارب. يتميز نمط الدفعات بكونه سهل التنفيذ، وفي حال استعمال قوارير مخبرية مُهتزَّة يمكن إجراء عدد كبير من التجارب بالتزامن في نفس الوقت. من سلبيات هذا النمط عندما يُطبق في البحوث هو أن كون النتائج صعبة التفسير بسبب الظروف الديناميكية خلال التجربة، أي أن الظروف البيئية التي تتعرض لها الخلية تتغير مع مرور الوقت. في المفاعلات الحيوية المتطورة تقنياً، يمكن الحفاظ على

كثير من المتغيرات ثابتة كالــpH والأكسيجين الذائب، مما يسمح بدراسة تأثير مادة أولية واحدة في نمو الكتلة الحيوية وتصنيع النواتج المطلوبة. إن معدل التخفيف (Dilution rate) يساوي صفراً في نمط المفاعلات بالدفعات (Batch)، بالتالي فإن توازنات الكتل للكتلة الحيوية والمادة الأولية المُحدِّدة للنمو[1] (Limiting substrate) هي كما يلي:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x; \quad x(t=0) = x_0 \qquad 30.6$$

$$\frac{dc_s}{dt} = -r_s x; \quad c_s(t=0) = c_{s,0} \qquad 31.6$$

في هذه المعادلة ترمز x_0 إلى تركيز الكتلة الحيوية الأولي عند بداية العملية، ونحصل على هذه القيمة مباشرة بعد التلقيح (Inoculation) أي زرع الكائن الحي في الوسط الغذائي. كما يرمز $C_{s,o}$ إلى التركيز الأولي للمادة الأولية المُحدِّدة للنمو. بناء على توازنات الكتل هذه سيرتفع تركيز الكتلة الحيوية، بينما يتناقص تركيز المادة الأولية حتى تصل قيمتها إلى صفر حيث يتوقف النمو. إذا افترضنا نموذج حركية "مونود" فإنه يمكن إعادة تنظيم معادلة توازن الكتل – للكتلة الحيوية والمادة الأولية المُحدِّدة للنمو – في معادلة تفاضلية من الدرجة الأولى (First-order differential equation) في تركيز الكتلة الحيوية، ومعادلة جبرية تربط تركيز المادة الأولية مع تركيز الكتلة الحيوية، وهذه العلاقة الجبرية موضحة بالمعادلة التالية:

$$c_s = c_{s,0} - Y_{xs}(x - x_0) \qquad 32.6$$

ويكون حل المعادلة التفاضلية لتركيز الكتلة الحيوية كما يلي:

$$-\frac{K_s}{c_{s,0} + Y_{xs}x_0} \ln\left(1 + \frac{x_0 - x}{Y_{sx}c_{s,0}}\right) \qquad 33.6$$

$$\mu_{\max}t = \left(1 + \frac{K_s}{c_{s,0} + Y_{xs}x_0}\right) \ln\left(\frac{x}{x_0}\right)$$

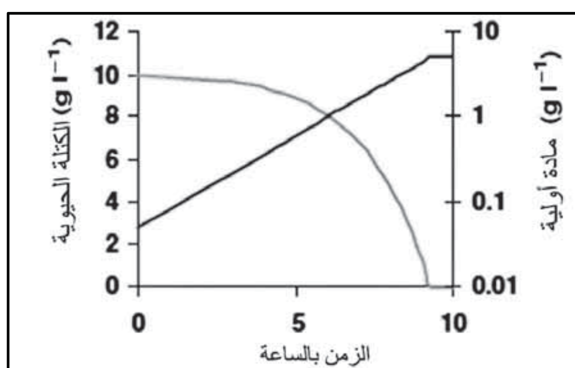
---

[1] هي المادة الأولية التي تستنفد أولاً.

باستعمال هذه المعادلات يمكن بسهولة اشتقاق مظهر (Profile) تركيز الكتلة الحيوية والكلوكوز في مفاعل دفعات نموذجي (انظر الشكل 10.6). بما أن تركيز المواد الأولية يعتبر صفراً في نهاية التجربة، فإن محصول الكتلة الحيوية الشامل على المواد الأولية يحسب من المعادلة التالية:

$$Y_{sx}^{overall} = \frac{x_{final} - x_0}{c_{s,0}} \qquad 34.6$$

حيث ترمز x_{final} إلى تركيز الكتلة الحيوية في نهاية عملية الزرع. تكون x_0 عادة تكون أقل من x_{final} بكثير ($x_0 << x_{final}$). يمكن تخمين مُعامل المحصول الشامل باستعمال التركيز النهائي للكتلة الحيوية وتركيز المادة الأولية في البداية فقط.



الشكل 10.6 : محاكاة وتخمين تركيز الكتلة الحيوية (الخط الثخين) والكلوكوز (الخط الدقيق) خلال عملية نمو بالدفعات (batch). تم تنفيذ التخمين باستعمال نموذج "مونود" حيث μ_{max} = 0.5 بالساعة (h^{-1}) و K_s = 0.05 غرام باللتر ($g\ l^{-1}$) و Y_{sx} = 0.50 غرام من المادة الجافة بكل غرام كلوكوز ($g\ DW\ (g\ glucose)^{-1}$).

لاحظ أن مُعامل المحصول الذي يؤخذ من المعادلة 34.6 هو مُعامل المحصول الشامل وليس Y_{sx} أو Y^{true}_{xs}. ومُعامل المحصول Y_{sx} يمكن أن تتغير قيمته مع الوقت (Time-dependent) لأنه عبارة عن نسبة معدل النمو النوعي على معدل امتصاص المادة الأولية (انظر المعادلة 2.6). ولكن في حال كان هناك اختلاف بسيط جداً بقيم هذه المُعاملات في نمط مفاعل الدفعات، مثلاً أن يكون طور النمو التصاعدي (Exponential growth phase) طويلاً، و طور الانحطاط في النمو سريعاً (Short declining growth phase)، عندها يكون مُعامل المحصول الشامل

ذا قيمة مشابهة إلى مُعامل المحصول. وإذا كان هناك أيض صيانة، سيصعب تحديد قيمة مُعامل المحصول الحقيقي في مفاعلات الدفعات (Batch)، ذلك لأنها تتطلب معلومات عن مُعامل الصيانة والذي يصعب تقديره في مفاعل الدفعات. أما إذا كان معدل النمو النوعي قريباً جداً من قيمته القصوى خلال مرحلة النمو، فسيكون استهلاك المادة الأولية من أجل عمليات الصيانة قليلاً يمكن إهماله، وبالاعتماد على المعادلة 14.6 يكون مُعامل المحصول الحقيقي ذا قيمة قريبة جداً من مُعامل المحصول الفعلي (الناتج من التجربة) والمحسوب من تركيز الكتلة الحيوية النهائي.

3.3.6 الثابت الكيميائي أو كيموستات Chemostat

تُعرف عملية التشغيل النموذجي للمفاعل الحيوي المستمر باسم الثابت الكيميائي أو كيموستات (Chemostat) حيث إن الوسط الغذائي المضاف يحتوي على مادة أولية محدِّدة واحدة (limiting substrate). ويمكن ذلك من الضبط والسيطرة على تغير معدل النوعي للكتلة الحيوية. ومن خلال تغيير معدل تدفق الغذاء (أي إضافة الوسط المغذي) إلى المفاعل، فإن ظروف المفاعل البيئية ستتغير، وبالتالي يمكن الحصول على معلومات قيِّمة عن تأثير تلك الظروف البيئية في فسلجة الخلايا. بالإضافة إلى كيموستات هناك أمثلة أخرى على مفاعلات بالنمط المستمر، مثلاً الــpH-stat حيث يتم ضبط تدفق التغذية من أجل الحفاظ على درجة حموضة ثابتة داخل المفاعل الحيوي، هناك أيضاً التربيدوستات Turbidostat الذي يتم ضبط تدفق التغذية من أجل الحفاظ على تركيز الكتلة الحيوية في مستوى ثابت. ومن معادلة توازن الكتل للكتلة الحيوية (29.6) يتبين بأن في المفاعلات المستمرة والمستقرة (Steady-state and continuous)، بأن معدل النمو النوعي يساوي معدل التخفيف (Dilution rate) كما يلي:

$$\mu = D \qquad 35.6$$

لذلك بتغير مقدار التخفيف (أو معدل تدفق التغذية Feed flow rate) في المفاعل المستمر نحصل على معدل نمو نوعي مختلف. هذا ما يسمح بدراسات فسيولوجية تفصيلية للخلايا أثناء نموها بمعدل نمو نوعي معين (يناسب بيئة معينة

تتعرض إليها الخلية). ففي حالة الاستقرار (steady state) يعطي توازن الكتل (36.6) للمادة الأولية ما يلي:

$$0 = -r_s x + D\left(c_s^f - c_s\right) \quad 36.6$$

والتي بعد اتحادها مع المعادلة السابقة (35.6) وتعريف مُعامل المحصول يؤدي إلى:

$$x = Y_{sx}\left(c_s^f - c_s\right) \quad 37.6$$

أي أنه يمكن تحديد قيمة مُعامل المحصول من خلال قياس الكتلة الحيوية وتركيز المادة الأولية في المفاعل الحيوي (يفترض بأن تركيز المادة الأولية في تدفق الغذاء معلوم).

وإذا تم تطبيق نموذج "مونود" فإن توازن الكتل للكتلة الحيوية سيعطي ما يلي:

$$D = \mu_{max}\frac{c_s}{c_s + K_s} \quad 38.6$$

أو:

$$c_s = \frac{D K_s}{\mu_{max} - D} \quad 39.6$$

وعليه فإن تركيز المادة الأولية المُحدِّدة (limiting substrate) يزداد بازدياد معدل التخفيف (dilution rate). وعندما يكون تركيز المادة الأولية معادل لتركيز المادة الأولية في الغذاء المتدفق فإن معدل التخفيف (dilution rate) يصل إلى أقصى قيمة له، وهو الذي يسمى معدل التخفيف الحرج (Critical dilution rate):

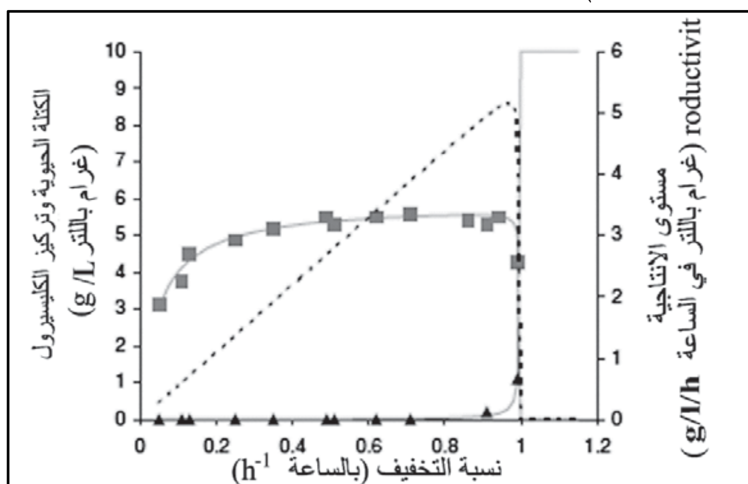
$$D_{crit} = \mu_{max}\frac{c_s^f}{c_s^f + K_s} \quad 40.6$$

وعندما تصبح قيمة معدل التخفيف مساوية أو أكثر من هذه القيمة، عندها يتم تنظيف الكتلة الحيوية من المفاعل الحيوي. تبين المعادلة 39.6 بوضوح أن كيموستات الحالة المستقرة مناسب جداً لدراسة تأثير تركيز المادة الأولية في الوظائف الخلوية، مثلاً إنتاج المواد، وذلك لأنه من خلال تغيير معدل التخفيف يصبح بالإمكان تغيير تركيز المادة الأولية باعتبارها العامل الوحيد المتغير. إضافة إلى ذلك يمكن دراسة تأثير مواد مُختلفة مُحدِّدة للفسلجة الخلوية.

إضافة إلى تحديد قيم معايير (Parameters) نموذج "مونود" فإن الكيموستات يناسب بشكل جيد لتحديد مُعامل الصيانة. بما أن معدل التخفيف يساوي معدل النمو النوعي فإن اتحاد المعادلتين 14.6 و 37.6 سيعطي ما يلي:

$$x = \frac{D}{Y_{xs}^{true} D + m_s} \left(c_s^f - c_s\right) \qquad 41.6$$

تبين المعادلة 41.6 بأن تركيز الكتلة الحيوية يتناقص عندما تكون معادلات النمو النوعي متدنية، وحيث يكون استهلاك المادة الأولية في عمليات الصيانة مرتفعاً مقارنة باستهلاكه من أجل النمو. وعندما تكون معدلات النمو النوعي مرتفعة (معدلات تخفيف مرتفعة) تكون الصيانة متدنية إلى درجة أن تُهمل قيمتها، ويكون مُعامل المحصول مساوياً لمُعامل المحصول الحقيقي. وبما أن μ= D في الحالة الثابتة المستقرة (Steady state) فإن المعادلة 13.6 تُعبّر عن وجود علاقة خطية (Linear) بين معدل الامتصاص النوعي للمادة الأولية (Specific substrate uptake rate) ومعدل التخفيف. من خلال هذه العلاقة الخطية يمكن تحديد قيمة مُعامل المحصول الحقيقي ومُعامل الصيانة باستعمال طريقة الانحسار الخطي (Linear regression).



الشكل 11.6: نمو *Aerobacter aerogenes* في كيموستات على كليسيرول كمادة أولية بتركيز يحدد سرعة النمو (limiting substrate). ينقص تركيز الكتلة الحيوية (■) عندما تكون معدلات التخفيف عالية بسبب أيض الصيانة (maintenance)، وعند وصول مقدار التخفيف لدرجة حرجة تبدأ قيمة الكتلة الحيوية بالانخفاض سريعاً. يرتفع تركيز الكليسيرول (▲) ببطء على درجات تخفيف

قليلة، ولكن عند وصول درجة التخفيف إلى الحد الحرج تبدأ بالارتفاع سريعاً. يعبّر الخط المتصل عن محاكاة بالنموذج الحسابي، باستعمل نموذج "مونود" مع عامل الصيانة ومقاييس عوامل أخرى كالتالي:

$Y_{xs}^{true} = 1.70g\ (g\ DW)^{-1}.\ 0.01g\ l^{-1}; m_s = 0.08g\ (g\ DW\ h)^{-1}$
$c_s^f = 10g\ l^{-1};\ \mu_{max} = 1.0\ h^{-1};\ K_s =$

يعبِّر الخط المتقطع عن مستوى الإنتاجية حسب المعادلة 42.6.

إن الكيموستات هو أنسب مفاعل لإنتاج كتلة حيوية، مثلاً خميرة الخبز أو إنتاج بروتين خلوي معين، وذلك لأن هذه المفاعلات تحافظ على إنتاجية عالية لفترة طويلة من الزمن أثناء العملية. إن إنتاجية الكتلة الحيوية تقاس بالمعادلة التالية:

$$P_x = Dx \qquad 42.6$$

وفي الشكل 11.6 نرى العلاقة بين الإنتاجية ومعدل التخفيف.

فإذا أدخلنا القيمة الجبرية (Expression) لتركيز الكتلة الحيوية (المعادلة 41.6) في المعادلة 42.6، مع إدخال المعادلة 39.6 لتركيز المادة الأولية، يمكن عندها حساب معدلات التخفيف التي تعطى أعلى إنتاجية. إذا لم يكن هناك صيانة، أي أن $m_s = 0$، عندها سيكون معدل التخفيف الأمثل (Optimal) كما في المعادلة التالية:

$$D_{opt} = \mu_{max}\left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{c_s^f + K_s}}\right) \qquad 43.6$$

ومن المهم أن التأكيد أن هذه القيم المثلى (Optimum) تنطبق فقط في نموذج مونود الحركي عندما تكون الصيانة صفراً. فإذا دخلت الصيانة كمتغير آخر، عندها يقتضي حساب معدل التخفيف الأمثل حل معادلة متعددة الحدود من الدرجة الثالثة (Third-degree polynomial). وسيكون لهذه المعادلة حل واحد في المجال المقبول لمعدلات التخفيف. ولكن عوضاً عن حل هذه المعادلة المعقدة، من الأنسب والأسهل إيجاد الحل بطريقة عددية (Numerically).

4.3.6 مفاعلات الدفعات–إطعام The fed-batch reactor

ربما يُعتبر هذا النوع من تشغيل المفاعلات الأكثر استعمالاً في العمليات الصناعية، ذلك لأنه يسمح بالسيطرة على الظروف البيئية المحيطة بالخلايا، كالحفاظ على تركيز الكلوكوز بمستوى معين، والحصول على أعلى عيار حجمي (High titre) (بضع مئات الغرامات باللتر لبعض نواتج الأيض)، الذي يعتبر مهماً جداً لعمليات المعالجة التالية في المراحل اللاحقة. هناك تشابه مُلفت بين هذه الأنواع من المفاعلات ومفاعلات الكيموستات. في مفاعلات الدفعات–إطعام يُحسب توازن الكتل للكتلة الحيوية وللمادة الأولية بناء عمّا جاء في المعادلتين 26.6 و 29.6 ضمن توازنات الكتل العامة. يكون عادة تركيز المادة الأولية C^f_s مرتفعاً في الإطعام، أي أن الغذاء عالي التركيز، وتدفق الغذاء إلى داخل المفاعل بطيء، ما يؤدي إلى معدل تخفيف قليل، كما تبين المعادلة التالية:

$$D = \frac{1}{V}\frac{dV}{dt} \qquad 44.6$$

وإذا تمّت المحافظة على قيمة ثابتة لــD ، فستستدعي الحاجة إلى ازدياد مُطّرد (Exponential) لتدفق الغذاء إلى المفاعل. إذا كان معامل المحصول ثابتاً، فإن دمج توازنات الكتل للكتلة الحيوية والمادة الأولية يكون كما في المعادلة التالية:

$$\frac{d(x + Y_{sx}c_s)}{dt} = \left[(\mu - D)x - Y_{sx}r_s x + Y_{sx}D\left(c_s^f - c_s\right)\right] \qquad 45.6$$

أو، بما أن: $\mu = Y_{sx}r_s$

$$\frac{d\left[x - Y_{sx}\left(c_s^f - c_s\right)\right]}{dt} = -D\left[x - Y_{sx}\left(c_s^f - c_s\right)\right] \qquad 46.6$$

وبدمجها مع المعادلة 44.6 يمكن حل هذه المعادلة التفاضلية بسهولة بواسطة المعادلة التالية:

$$\frac{Y_{sx}\left(c_s^f - c_{s,0}\right) - x_0}{Y_{sx}\left(c_s^f - c_s\right) - x} = \frac{V}{V_0} \qquad 47.6$$

حيث x_0 و $c_{s,0}$ و V_0 ترمز بالتسلسل إلى تركيز الكتلة الحيوية، وتركيز المادة الأولية وحجم المفاعل الحيوي في بداية عملية دفعات–إطعام (Fed-batch). يكون

تركيز المواد الأولية في دفعات الاطعام c^f_s عادة أعلى بكثير من تركيز كل من المادة الأولية في البدء (Initially) ومن تركيزها أثناء العملية (c_s). ويعني ذلك أن $Y_{sx}c^f_s$ قيمتها أكبر من قيمة الكتلة الحيوية في البدء وفي نهاية العملية أيضاً، لذلك يمكن المحافظة على ازدياد قليل في الحجم حتى عندما يكون تركيز الكتلة الحيوية عالياً جداً.

اذا كان هناك ازدياد مُطّرد (Exponential) لتدفق الغذاء إلى المفاعل، سنحصل على نمو كتلة حيوية ذي قيمة ملحوظة، وبما أن تركيز الكتلة الحيوية يزداد، سيؤدي ذلك إلى نقص في توفر الأكسجين. وعليه يتم عادة رفع مستوى تدفق الغذاء حتى تصبح كمية الأكسجين محدودة، عندها يتم تثبيت معدل تدفق الغذاء. سيؤدي ذلك إلى تناقص معدل النمو النوعي. ولكن، بما أن تركيز الكتلة الحيوية يزداد في العادة، فإنه يمكن الحفاظ عل الثبات (تقريباً) معدل الامتصاص الحجمي للمواد الأولية، من ضمنها الأكسيجين. يتبين واضحاً مما تقدم وجود استراتيجيات إطعام مختلفة في عملية دفعات–إطعام (Fed-batch)، وأن عملية الضبط من أجل الحصول على أفضل منتوج (Optimization) هي مهمة صعبة ومعقدة، ومن الصعب حلها بالطرق التجريبية (Empirically). حتى عندما يتوفر نموذج حسابي جيد، تبقى عملية حساب أفضل برنامج إطعام هو مشكلة معقدة. خلال بحث تجريبي عن أفضل برنامج للإطعام لا بد من أخذ مسألتين مهمتين بعين الاعتبار:

- المحافظة على قيمة ثابتة لتركيز المواد المُحدِّدة للنمو.
- المحافظة على قيمة ثابتة لمعدل النمو الحجمي للكتلة الحيوية (أو امتصاص مادة أولية معينة).

يتم تطبق ثبات قيمة معدل النمو الحجمي للكتلة الحيوية (أو امتصاص مادة أولية معينة)، عندما يكون توفير الأكسيجين محدوداً، أو يكون تصريف الحرارة غير كافٍ، وغالباً ما تكون الحالة هكذا. غالبًا ما يتم تطبيق التركيز الثابت للمادة الأولية المُحدِّدة إذا كانت المادة الأولية تسسبب تثبيطاً في تصنيع المُنتَج، يتم في هذه الحالة اختيار تركيز المادة الأولية بناء على درجة التثبيط، وعلى الرغبة في استمرار شيء من نمو الخلايا. إن برنامج الإطعام المطلوب من أجل المحافظة

على تركيز ثابت للمادة الأولية C_s المتوافق مع معدل نمو نوعي ثابت μ_0، يمكن اشتقاقه بسهولة من المعادلة 28.6 عندما يكون F_{out} =0.

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu_0 xV \qquad 48.6$$

$$xV = x_0 V_0 e^{\mu_0 t} \qquad 49.6$$

وبما أن تركيز المادة الأولية ثابت فإن توازن المادة الأولية سيكون:

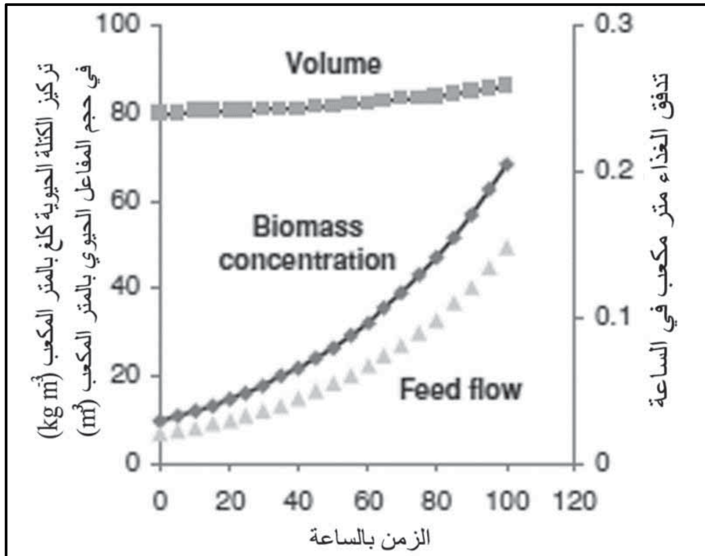
$$-Y_{xs}\mu_0 x + D\left(c_s^f - c_s\right) = 0 \qquad 50.6$$

$$F(t) = \frac{Y_{xs}\mu_0}{c_s^f - c_s} xV = \frac{Y_{xs}\mu_0}{c_s^f - c_s} x_0 V_0 e^{\mu_0 t} \qquad 51.6$$

وأخيراً، نحصل على تركيز الكتلة الحيوية x(t) من المعادلة 47.6 وذلك مع $C_{s,0} = C_s$:

$$\frac{x(t)}{x_0} = \frac{e^{\mu_0 t}}{1 - ax_0 + ax_0 e^{\mu_0 t}} \qquad 52.6$$

$$a = \frac{Y_{xs}}{c_s^f - c_s} \qquad 53.6$$



الشكل 12.6: تركيز الكتلة الحيوية (رمز مربع) وحجم المفاعل الحيوي (رمز معين) وقيمة تدفق الإطعام (feed flow rate) (رمز مثلث) إلى مفاعل دفعات-إطعام مع تركيز ثابت للمادة

الأولية. اعتُبِرت قيمة مُعامل المحصول Y_{sx} 0.5 غرام مادة جافة لكل غرام كلوكوز (g DW(g glucose)$^{-1}$) ومعدل النمو النوعي الثابت μ_0 يعتبر هنا بقيمة 0.02 بالساعة (h^{-1}) وتركيز المادة الأولية في الإطعام C^f_s هي 400 كلغ بالمتر المكعب (kg m^{-3}). تم افتراض أن تركيز المادة الأولية أقل بكثير من قيمة C^f_s. إن تركيز الكتلة الحيوية في بدء العملية x_0 وحجم المفاعل الحيوي في البدء يعتبران بالتسلسل 10 كلغ بالمتر المكعب (kg m^{-3}) و 80 متر مكعب (m^3).

وحجم المفاعل الحيوي يحسب كما يلي:

$$\frac{V}{V_0} = 1 - ax_0 + ax_0e^{\mu_0 t} \qquad 54.6$$

يبين الشكل 12.6 مظهراً نمطياً للعلاقة بين تركيز الكتلة الحيوية وحجم المفاعل ومعدل تدفق الغذاء خلال عمليات دفعات–إطعام مع اعتبار تركيز المواد الأولية ثابتاً.

بدأ استعمال نمط الزرع دفعات–إطعام (Fed-batch) في عام 1915 من قِبل Dansk Gærindustri ولازال يستخدم في إنتاج خميرة الخبز. ولفترة طويلة كانت تسمى هذه الطريقة بالطريقة الدنماركية (Danish method). في عمليات دفعات–إطعام الحديثة لإنتاج الخمائر أصبح إطعام السائل السكري (Molasses) تحت مراقبة وضبط مشدد معتمداً على قياس آلي لأدنى كميات (Traces) الإيثانول في الغاز النافذ من المفاعل (Exhaust gas). بالرغم من أن هذا النظام قد يؤدي إلى معدل نمو متدن، فإن محصول الكتلة الحيوية مرتفع وقد يقارب أعلى مستوى يمكن الوصول إليه. وتبدو أهمية ذلك بشكل خاص في إنتاج خميرة الخبز، حيث يكون التركيز على كمية المحصول. بالإضافة إلى إنتاج خميرة الخبز، تُعتمد عملية دفعات–إطعام لإنتاج مركبات أيض ثانوية (Secondary metabolites) (أشهرها عائلة البنيسيلين) وأنزيمات لأغراض صناعية ومركبات كثيرة أخرى مشتقة من عمليات التخمير.

Further reading 6.4 مراجع للتوسع

Herbert, D. “Some Principles of Continuous Culture.” *Recent Progress in Microbiology:* vol. 7 (1959), pp. 381-396. A reference paper on maintenance metabolism Very clear in its presentation

Monod, J. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes.* Paris: Hermann et Cie, 1942. A classic paper on kinetics of microbial growth. The original paper specifies the kinetics and gives a qualitative description of cellular growth kinetics.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, and M. Schaechter, *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. An excellent monograph on microbial physiology. The book gives a very comprehensive description of the growth physiology of bacteria. The description of microbial biochemistry is very well structured and excellent for both teaching and research.

Nielsen, J., J. Villadsen, and G. Lidén. *Bioreaction Engineering Principles*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. A comprehensive monograph on modelling of fermentation processes. The book treats both growth kinetics and design of bioreactor operation.

Pirt, S. J. “The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures.” *Proceedings of the Royal Society London, Series B:* vol. 163 (1965), pp. 224-231 A classic paper on maintenance metabolism. The paper is very clear in its presentation.

Roels, J. A. *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1983. An excellent monograph on thermodynamics and kinetics of cellular growth.

Stephanopoulos, G., J. Nielsen and A. Aristodou, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies.* San Diego: Academic Press, 1998. A comprehensive monograph on modern theoretical methods applied in fermentation physiology and metabolic engineering. The book describes the theory behind metabolic flux analysis, metabolic control analysis, and thermodynamics of cellular reactions.

الفصل السابع

تصميم المفاعلات الحيوية

Bioreactor Design

Yusuf chisti | **يوسف جيستي**

Massey University, New Zelanda | **جامعة ماسي، نيوزيلاند**

	Nomenclatur	**التسمية**
A_d	**cross-sectional are of downcomer (m^2)**	**مساحة المقطع العرضي للنازل**
A_H	area for heat transfer (m2)	**مساحة النقل الحرارية**
A_r	cross-sectional area of the riser (m2)	**مساحة المقطع العرضي للصاعد**
a	parameter in Eq. (7.8) (--)	**عامل في المعادلة 8.7 (-)**
C_p	specific heat capacity of the broth (J /kg/ ◦C/)	**السعة الحرارية المتخصصة للوسط الزراعي المائع (J/kg/°C)**
c	dimensionless constant (--)	**ثابت عديم الأبعاد (-)**
d	characteristic length dimension (m)	**أبعاد الطول الخاص (m)**
d_i	diameter of the impeller (m)	**قطر الخافق (m)**
d_p	particle diameter (m)	**قطر الحبيبة (m)**
d_T	diameter of bubble column or tank (m)	**قطر عمود الفقاعات أو الحوض (m)**
d_w	fermenter wall thickness (m)	**سمك جدار المخمر (m)**
e	energy dissipation rate per unit mass of fluid (J /s/ kg)	**معدل اضمحلال الطاقة لكل وحدة كتلية للمائع (J/S/ kg)**
G_r	Grashof number (--)	**رقم غراشوف (-)**

g	gravitational acceleration (m s−2)	**التسارع الجذبي (ms^{-2})**
h_f	jacket side fouling film heat transfer coefficient (J s/ m−2 ◦C/)	**معامل الانتقال الحراري للغشاء المترسب على جانب الغلاف (Js^{-1} $m^{-2.}$ C^{-1})**
h_i	film heat transfer coefficient for the cooling water on the jacket side (J/ s/ m^2 /°C)	**معامل النقل الحراري للغشاء لماء التبريد على جانب الغلاف (Js^{-1} $m^{-2.}$ C^{-1})**
h_L	height of gas-free liquid (m)	**ارتفاع المائع الخالي من الغاز (m)**
h_o	broth film heat transfer coefficient (J /s/ m^2 ◦C)	**معامل النقل الحراري لغشاء مائع الوسط الزراعي (Js^{-1} $m^{-2.}$ C^{-1})**
k	parameter in Eq. (7.8) (m^{-1})	**عامل في المعادلة 8.7 (m^{-1})**
K_j	impeller-dependent constant (--)	**ثابت معتمد على الخفاق (-)**
K_T	thermal conductivity of the culture broth (J s/ m/ ◦C/)	**التوصيل الحراري للوسط الزراعي المائع (Js^{-1} $m^{-2.}$ C^{-1})**
K_W	thermal conductivity of the fermenter wall (J s/ m/ ◦C/)	**التوصيل الحراري لجدار المخمر (Js^{-1} $m^{-2.}$ C^{-1})**
l	mean length of the energy dissipating fluid eddy (m)	**معدل الطول لداومة المائع متبدد الطاقة (m)**
N	rotational speed of the impeller (s/)	**سرعة دوران الخافق (s^{-1})**
N_u	Nusselt number (--)	**رقم ناسيلت (-)**
n	flow behaviour index of a fluid (--)	**دليل سلوك السريان للمائع (-)**
p	power input in gas-free state (J s/)	**القوة الداخلة في الحالة الخالية من الغاز (Js^{-1})**
P_G	power input in presence of gas (J s/)	**القوة الداخلة بوجود الغاز (Js^{-1})**
P_o	power number (--)	**رقم القوة (-)**

P_r	Prandtl number (--)	رقم برانتل (-)
Q	volumetric gas flow rate (m^3 s/)	معدل سريان الغاز الحجمي ($m^3 s^{-1}$)
Q_H	heat transfer rate (J/ s)	معدل النقل الحراري (Js^{-1})
R_e	Reynolds number (--)	رقم رينولدز (-)
R_{ei}	impeller Reynolds number (--)	رقم رينولدز للخافق (-)
SG	sight glass	زجاج الرؤيا
ΔT	temperature difference (◦C)	اختلاف الحرارة (C°)
U_G	superficial gas velocity based on the total cross-sectional area of the vessel (m/s)	سرعة الغاز السطحية بالاستناد إلى المساحة الكلية للمقطع العرضي للحوض (ms^{-1})
U_{Gr}	superficial velocity of gas in riser (m/s)	سرعة الغاز السطحية في الصاعد
U_H	overall heat transfer coefficient (J/s/ m^2/◦C)	معامل النقل الحراري العام ($Js^{-1}\ m^{-2.}\ C^{-1}$)
U_L	superficial liquid velocity (m s-1)	السرعة السطحية للمائع (ms^{-1})
V_L	volume of liquid in the reactor (m^3)	حجم الماء في المفاعل (m^3)
β	coefficient of volumetric expansion (m3 kg/ ◦C)	معامل التمدد الحجمي ($m^3\ kg^{-1}.\ C^{-1}$)
γ	average shear rate (s^{-1})	متوسط معدل القص (S^{-1})
γ_{max}	maximum shear rate (s^{-1})	معدل القص الأقصى (S^{-1})
ε_L	volume fraction of liquid (--)	القص الحجمي للمائع (-)
μ_L	viscosity of liquid (kg/m/s)	المائع لزوجة ($kgm^{-1}\ S^{-1}$
μ_w	viscosity of water (kg/m/s)	لزوجة الماء ($kgm^{-1}\ S^{-1}$)
μ_{Lw}	viscosity of liquid at wall temperature (kg m/s)	لزوجة المائع عند درجة حرارة الجدار ($kgm^{-1}\ s^{-1}$)
P_L	density of liquid or slurry (kg/m^3)	كثافة المائع (kgm^{-3})
T	shear stress (N/m)	جهد القص (Nm^{-2})

1.7 المقدمة Introduction

المفاعل الحيوي (Bioreactor) أو المخمر هو عبارة عن وعاء يستخدم لإجراء تفاعل كيموحيوي واحد أو أكثر لغرض تحويل مادة (المادة الأولية) إلى ناتج من نوع ما. تُعَدُّ المفاعلات الحيوية جزءاً ضرورياً في أي عملية إنتاج تعتمد على التقنية الحيوية، سواء كانت لأجل إنتاج كتلة حيوية، أو مواد أيضية، أو في عملية التحويل الحيوي لمركب ما إلى مركب آخر، أو في تحطيم الفضلات غير المرغوبة. تحفز التفاعلات التي تحدث في المفاعلات الحيوية بواسطة محفزات حيوية، مثل الأنزيمات أو الأحياء المجهرية أو خلايا من الحيوانات والنباتات أو مركبات خلوية مثل المايتوكوندريا والكلوروبلاست.

يوفر المفاعل الحيوي بيئة تحقق الظروف الوظيفية المثلى للمحفز الحيوي. ويحتوي مفاعل الإنتاج الحيوي عادة على سلسلة من المفاعلات الحيوية بسعات مختلفة تتراوح بين 20 L إلى $250\ m^3$. وقد تسخدم مفاعلات أكبر من ذلك في عمليات معينة. تعمل المفاعلات، وفي معظم الحالات، بطريقة الدفعة (Batch) أو الدفعة المغذاة – (Fed Batch) وتحت ظروف معقمة. تبدأ معظم عمليات التخمير الشائعة بزراعة الكائنات المجهرية أو الخلايا في مفاعلات حيوية صغيرة. وبعد زمن محدد مسبقاً للدفعة، ينقل محتوى المفاعل الصغير إلى مفاعل أكبر حجماً مملوءاً بالوسط الزرعي المعقم، وتتم إعادة هذه العملية إلى حين الوصول إلى مخمر الإنتاج، وهو أكبر مفاعل في السلسلة. تجري معظم العمليات التجارية بشكل مزارع مغمورة، حيث يضاف الحفاز الحيوي إلى الوسط المغذي في المفاعل المناسب. يركز هذا الفصل على الأنواع الشائعة من المفاعلات المستخدمة في العمليات الصناعية المختلفة وعلى الاعتبارات التصميمية لكل من هذه المفاعلات. تشمل أنواع المفاعلات الرئيسية التي سيتم التطرق لها:

- المفاعلات الحوضية المخفوقة (Stirred Tank Reactors)
- أعمدة الفقاعات (Bubble Columns)
- مفاعلات الرفع الهوائي (Airlift Devices)

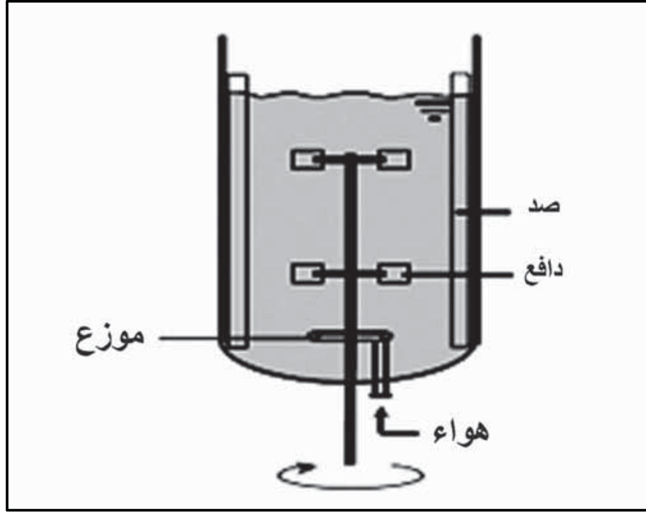
- المهود المحشوّة (Packed Beds)
- المهود المسالة (Fluidised Beds)
- المفاعلات الحيوية الضوئية (Photobio-Reactors)
- بغضّ النظر عن الشكل المتخصص للمفاعل المطلوب لإجراء عملية معينة، فإن تصميم المفاعل الحيوية يتطلب الانتباه إلى عدة جوانب أخرى، هي:

1- الحاجة إلى الحفاظ على العملية بشكل مزرعة أحادية الخمج (Monoseptic)، (أي، حاوية على نوع واحد فقط من الخلايا).
2- الحاجة إلى الخلط لضمان انتشار الحفاز الحيوي كمعلق والحصول على بيئة متجانسة نسبياً في المفاعل الحيوي.
3- تجهيز الأكسجين وإزالة ثاني أكسيد الكربون.
4- تجهيز المواد الغذائية الأخرى بطريقة تضمن عدم تجاوز معدل التخمير لقابلية عمل الحفاز الحيوي.
5- النقل الحراري لأجل السيطرة على درجة الحرارة.
6- السيطرة على معدلات جهد القص (Shear stress) في المفاعل الحيوي بحيث لا يتضرر الحفاز الحيوي بواسطة القوى الهيدروداينميكية المختلفة.

2.7 أشكال المفاعلات الحيوية Bioreactor configuration

1.2.7 مفاعلات الحوض المخفوق Stirred tank reactor

تتكون هذه المفاعلات من أحواض أسطوانية تحتوي على عمود مركزي يتحرك بواسطة محرك وسند واحد أو أكثر من الخفاقات (Agitators). قد يدخل العمود من أعلى أو من قاعدة المفاعل. يوضح الشكل 1.7: مفاعل حوضي مخفوق مثالي.



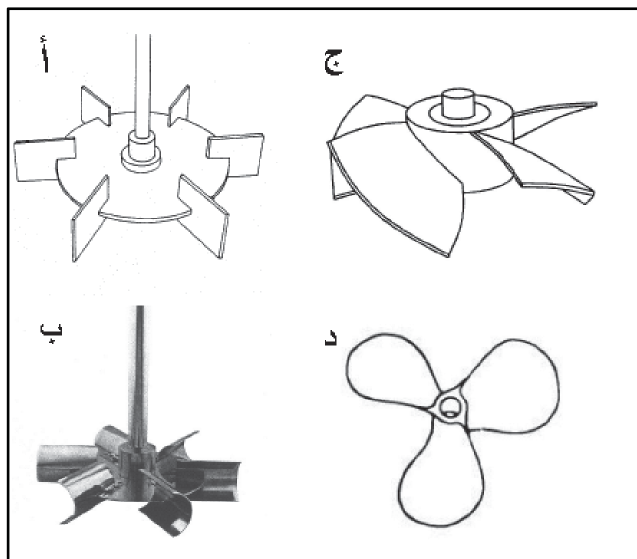
الشكل 1.7: مفاعل حيوي ذو الحوض المخفوق.

يجهز حوض مزرعة الأحياء المجهرية عادة بأربعة حواجز (Baffles) تمتد من الجدران إلى الوعاء لمنع حدوث الدوامات (Vortexing) للمائع. يبلغ عرض الحاجز 10/1 أو 12/1 من قطر الحوض. أما نسبة الوجاهة (Aspect ratio) (أي، نسبة الارتفاع إلى القطر) للحوض فهي 3 إلى 5، باستثناء العمليات التي تستخدم مزرعة خلايا حيوانية، حيث لا تزيد النسبة في هذه الحالة على 2 عادة.

لا تزود أحواض مزارع أو مستنبتات الخلايا الحيوانية (Animal cell culture) بالحواجز غالباً (خاصة في حالة المفاعلات صغيرة الحجم) لأجل التقليل من الاضطراب (Turbulance) في المائع التي قد تؤدي إلى إحداث أضرار في الخلايا. يعتمد عدد الخفاقات المستخدمة على نسبة الوجاهة. تبعد الخفاقة السفلى بمسافة 1/3 قطر الحوض فوق قعره.

هناك خفاقات إضافية تبعد عن بعضها البعض بمسافات تقدر بحوالى مرة أو مرتين قطر الخفاقة. أما قطر الخفاقة فيبلغ حوالى ثلث قطر الحوض بالنسبة إلى الخفاقات التي تنشر الغاز مثل توربينات قرص روشتون (Rushton disc turbines) والخفاقات ذات الشفرات المحدبة (الشكل 2.7). أما خفاقات المطيار المائي "الهيدروفويل" (Hydrofoil) الأكبر حجماً (الشكل 2.7) فيبلغ قطرها 0.5

إلى 0.6 قطر الحوض، وتكون فعالة بشكل خاص في خلط الكميات الكبيرة، وهي تستخدم في المخمرات التي تحتوي على أوساط فطرية (Mycelia broths) ذات لزوجة عالية. أما أحواض مزارع الخلايا فإنها تجهز بخفاقة (Impeller) مفردة ذات قطر كبير وقوة جز قليلة مثل الدافعات البحرية (الشكل 2.7).



الشكل 2.7: بعض أنواع الخفاقات الشائعة: (أ) توربين قرص روشتون، (ب) خفاقات الشفرات المحدبة، (ج) خفاقة الهيدروفويل، (د) الدافعة البحرية.

ينشر الغاز (Sparged) في مائع المفاعل في باطن الخفاقة باستخدام أنبوب حلقي مثقوب (ناشر) يكون قطره أصغر قليلاً من قطر الخفاقة. يستخدم أحياناً ناشر غاز بشكل أنبوب يحتوي على ثقب واحد فقط.

عند استخدام مزارع الخلايا الحيوانية أو النباتية فإن سرعة الخفاقة لا تتجاوز عادة 120 دورة في الدقيقة في الأحواض التي يزيد حجمها على 50 لتراً. أما في حالة مزارع الكائنات المجهرية (Microbial cultures) فالسرعة المستخدمة هي أعلى من ذلك باستثناء المزارع التي تحتوي على مايسيليا (Mycelia) أو خيوط فطرية حيث لا تزيد سرعة قمة الخافق (Tip speed) في هذه الحالة (أي، $x\pi$ قطر الخفاقة × سرعة الدوران) على 6.7 متر في الثانية. هذا

وقد لوحظ حدوث أضرار في مايسيليا فطريات معينة حتى في حالة استخدام سرعات أقل. إن سرعة التهوية السطحية (المعدل الحجمي لسريان الغاز مقسوم على مساحة المقطع العرضي للحوض) في أحواض الخفق يجب أن تُبقي معدل نشر الغاز أقل من القيمة المطلوبة لغمر الخفاقة (Impeller flooding) (تغمر الخفاقة عندما تستلم غازاً أكثر مما تستطيع توزيعه بشكل فعال).

وتُكوّن الخفاقة المغمورة خلاطاً رديئاً. لذا، لا تزيد سرع التهوية السطحية عادة على 0.05 m/s.

تعتبر الأحواض المخفوقة من بين أكثر أنواع المفاعلات الحيوية استعمالاً، خصوصاً في عمليات إنتاج المضادات الحيوية والأحماض العضوية.

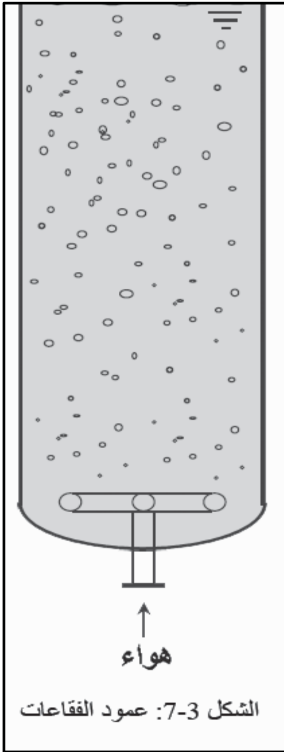
2.2.7 أعمدة الفقاعات Bubble coulumns

يوضح الشكل 3.7 مفاعلاً حيوياً من نوع عمود الفقاعات. يكون العمود عادة أسطوانياً، وبنسبة وجاهة تتراوح ما بين 4 إلى 8. ينشر الغاز عند قاعدة العمود من خلال أنابيب أو صفائح مثقبة أو من خلال ناشرات ذات ثقوب مجهرية مصنوعة من الزجاج أو المعدن. تتأثر عمليات انتقال الأكسجين والخلط وغيرها من عوامل الأداء بشكل رئيسي بمعدل سريان الغاز وخصائص السائل. قد توضع أدوات أخرى داخل الخزان مثل الصفائح الأفقية المثقبة والحواجز العمودية والرقائق المتموجة المنضدة لغرض تحسين معدل النقل الكتلي ولتحوير التصميم الأساسي.

لا يؤثر قطر العمود في عمل المفاعل ما دام القطر يزيد على 0.1 m. وأحد الاستثناءات في ذلك عمود الخلط المحوري (Axial mixer). فعند معدل سريان غاز معين، تتحسن عملية الخلط مع زيادة قطر الحوض. كما أن النقل الكتلي والحراري ومعدل القص السائد تزداد بزيادة معدل سريان الغاز. لا تزيد السرعة القصوى للتهوية في أعمدة الفقاعات على 0.1 m/s (انظر الفصل الثامن كذلك). إن مفاعلات أعمدة الفقاعات ملائمة بشكل رئيسي للاستخدام في المعاملة الحيوية لماء الصرف الصحي وغيرها من عمليات التخمير الأقل لزوجة نسبياً.

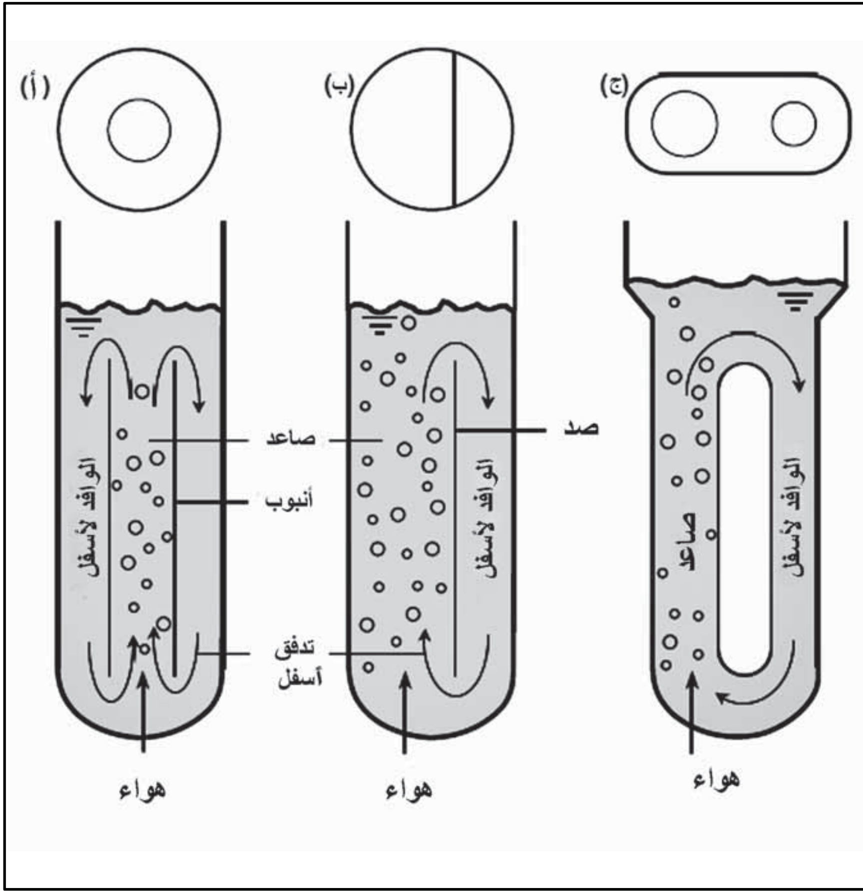
3.2.7 مفاعلات الرفع الهوائي الحيوية Airlift bioreactor

يقسم المائع في حوض مفاعل الرفع الحيوي الهوائي إلى منطقتين متصلتين، وذلك بواسطة حاجز (Baffle) أو أنبوب سفط (Draft tube)، وكما هو موضح بالشكل 4.7. ينشر الهواء أو أي غاز آخر في أحد المنطقتين فقط. تدعى المنطقة التي ينشر فيها الغاز بالصاعد (Riser)، في حين تسمى المنطقة التي لا تستلم الغاز بالنازل (Downcomer). إن الكثافة العمومية للمنطقة التي يختلط فيها الغاز والمائع في منطقة الصاعد عادة أقل من الكثافة العمومية في منطقة النازل، وبالتالي فإن سريان انتشار الغاز سيكون نحو الأعلى في منطقة الصاعد ونحو الأسفل في منطقة النازل. بدل الحاجز، يكون الصاعد والنازل أحياناً ممثلين بأنبوبين عموديين منفصلين يرتبطان ببعضهما البعض في القمة والقاعدة لتكوين أنشوطة دوران خارجية. لأجل الحصول على أداء مثالي في عملية النقل الكتلي من الغاز إلى المائع، فإن نسبة مساحة المقطع العرضي للصاعد إلى النازل يجب أن تكون بين 1.8 و 4.3. إن مفاعلات الرفع الهوائي بشكل الأنشوطة الخارجية أقل شيوعاً في الاستخدامات التجارية مقارنة بالتصاميم التي تكون بشكل أنشوطة داخلية. فالأنشوطة الداخلية تكون إما على شكل أنبوب سفط متمركز، أو على شكل اسطوانة منشطرة (Split cylinder).



الشكل 3-7: عمود الفقاعات

تتميز المفاعلات الحيوية ذات الرفع الهوائي بكفاءتها العالية في استخدام الطاقة مقارنة بالمخمرات المخفوقة، إلا أن إنتاجية كلا النوعين متقاربة. بما أن مفاعلات الرفع الهوائي مناسبة بشكل خاص للمزارع الحساسة لتأثير القص، فهي غالباً ما تستخدم في التصنيع التجاري للبروتينات الصيدلانية المستحصلة من الخلايا الحيوانية الهشة.



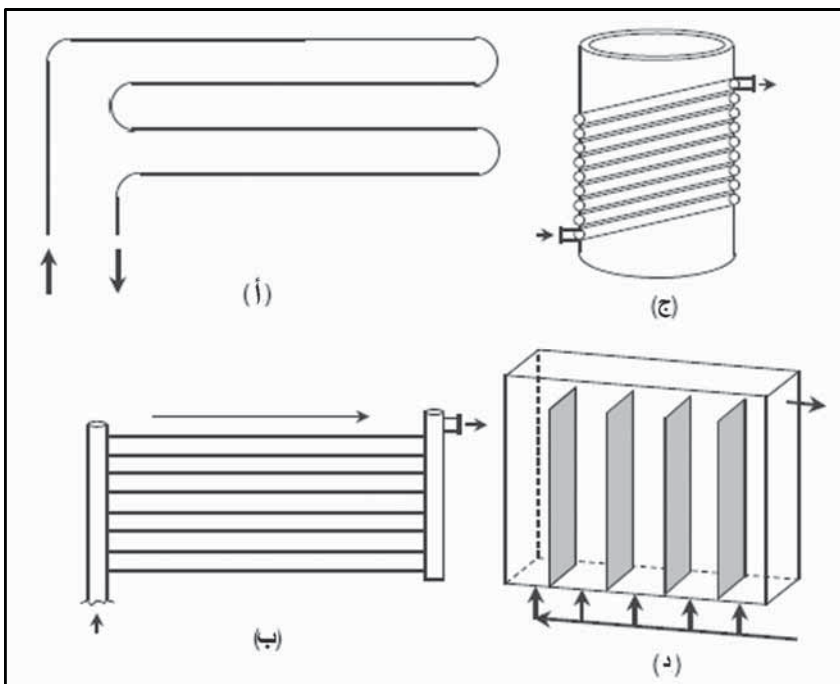
الشكل 4.7: مفاعلات الرفع الهوائي الحيوية: (أ) أنبوب سفط أنشوطة داخلية (ب) أسطوانية منشطرة، و(ج) نظام الأنشوطة الخارجية.

إضافة إلى ذلك، فإن مفاعلات الرفع الهوائي تستعمل في المعاملة الحيوية لماء الصرف الصحي وفي إنتاج الديدان الخيطية الفاتلة للحشرات، وفي التخمرات الأخرى ذات اللزوجة المنخفضة. إن قدرة مفاعلات الرفع الهوائي فيما يخص النقل الحراري والكتلي هي، على الأقل، بنفس مستوى الأنظمة الأخرى. كما أنها أكثر فاعلية في تعليق المواد الصلبة في المائع من مفاعلات أعمدة الفقاعات. يرتبط أداء مفاعلات الرفع الهوائي بشكل رئيسي بمعدل حقن الغاز ومعدل الدوران (Circulation rate) الناتج للسائل. وبصورة عامة، يزداد معدل دوران السائل طردياً مع الجذر التربيعي لارتفاع أنبوبة رفع الهواء. وعليه يتم تصميم هذه

المفاعلات بنسب وجاهة عالية. بما أن سبب دوران السائل يعود إلى الفرق في كمية الغاز بين النازل والصاعد، فإن معدل الدوران يزداد بغياب أو وجود قليل من الغاز في النازل. يأتي جميع الغاز الموجود في النازل من انسيابه مع المائع أثناء سريانه إلى النازل قادماً من الصاعد قرب قمة المفاعل. تستخدم أحياناً تصاميم مختلفة من عازلات الغاز السائل (Gas-liquid separator) في منطقة الرأس للمفاعل من أجل التقليل أو منع انتقال الغاز إلى النازل. إن استخدام عازلات مصممة بشكل مناسب يزيد دائماً من دوران المائع مقارنة بالمفاعلات التي لا تحتوي على مثل هذه العازلات. أي أن زيادة القوة الدافعة للدوران سوف تعوض وتزيد على أي مقاومة، إضافة إلى السريان بسبب وجود هذه العازلات.

4.2.7 المهود المسالة Fluidised beds

مفاعلات المهود المسالة مناسبة للتفاعلات التي تشتمل على حبيبات معلقة في الحفازات الحيوية (Biocatalysts)، مثل الأنزيمات المقيدة (Immobilised enzymes) والخلايا وتجمعات الكائنات المجهرية. يستعمل مجرى من المائع المتحرك نحو الأعلى لتعليق أو لإسالة (Fluidise) المواد الصلبة (انظر الشكل 5.7). يشبه هذا المفاعل من الناحية الهندسية مفاعل عمود الفقاعات باستثناء كون القص العلوي أكثر اتساعاً من أجل تقليل السرعة السطحية للمائع إلى مستوى أقل من ذلك المطلوب لإبقاء المواد الصلبة معلقة في السائل. وبالتالي، فإن المواد الصلبة سوف تترسب في المنطقة الواسعة وتنزل إلى عمود المفاعل الأضيق في القص الأسفل. وبهذا ستبقى المواد الصلبة في المفاعل، في حين يسيل المائع إلى الخارج. يمكن نشر الهواء، أو أي نوع آخر من الغازات في مفاعلات المهود المسالة لتكوين مهد مسال من غاز – مائع – صلب. إذا كانت الحبيبات الصلبة خفيفة جداً، قد يكون من الضروري زيادة وزنها صناعياً، وذلك عن طريق استعمال، على سبيل المثال، كرات من الفولاذ الذي لا يصدأ في المادة الأساس الصلبة الخفيفة.



الشكل 5.7: مفاعل المهد المسال.

إن وجود مواد صلبة ذات كثافة عالية يحسّن من عملية النقل الكتلي من صلب إلى مائع عن طريق زيادة السرعة النسبية بين الأطوار. كما أن المواد الصلبة الكثيفة تترسب بسهولة أكبر، ولكن الكثافة لا يجب أن تكون عالية جداً مقارنة بكثافة المائع وإلا فإن عملية التسييل (Fluidization) ستكون صعبة.

عادة ما تكون مفاعلات المهود المسالة خامدة (Quiescent)، إلا أن إدخال الغاز يؤدي إلى زيادة ملحوظة في اضطراب حركة المائع. حتى في حال استخدام حبيبات خفيفة نسبياً، فإن السرعة السطحية المطلوبة لتعليق المواد الصلبة قد تكون عالية جداً مما يؤدي إلى ترك المائع للمفاعل بسرعة كبيرة، أي أن زمن التماس بين الصلب والمائع سيكون غير كافٍ للتفاعل. يجب في هذه الحالة، تدوير (Recycle) المائع لضمان حدوث زمن اتصال تراكمي كافٍ مع الحفاز الحيوي (Biocatalyst). إن سرعة التسييل، أي السرعة السطحية للمائع المطلوبة لتعليق المواد الصلبة من الحالة المترسبة، تعتمد في هذه الحالة على عدة عوامل، من ضمنها اختلاف الكثافة بين الأطوار وقطر الحبيبات ولزوجة المائع.

5.2.7 المهود المحشوّة Packed beds

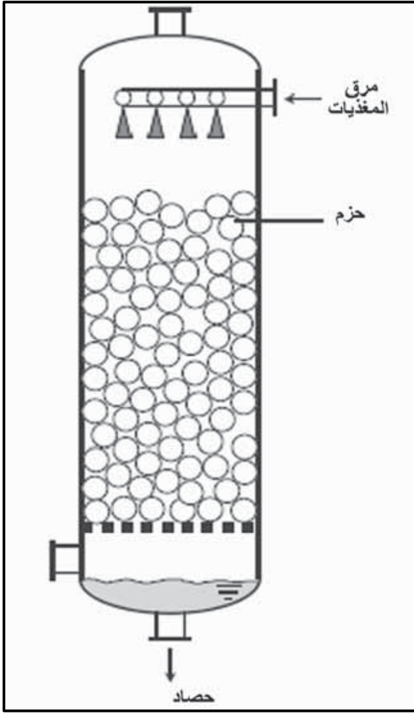
مفاعل المهد المحشو هو عبارة عن مهد (Bed) مكون من حبيبات صلبة ومحاطاً بجدران (الشكل 6.7). يوضع الحفاز الحيوي على سطح أو في داخل المادة الأساس الصلبة والتي قد تكون هلاماً مسامياً (Porous) مثقباً أو هلاماً متجانساً غير مسامي. قد تكون المواد الصلبة في المهد عبارة عن حبيبات بوليمرية قابلة للضغط أو مواد أكثر صلابة. يسري مائع، يحتوي على المواد الغذائية، بصورة مستمرة عبر المهد ليوفر حاجات الحفاز الحيوي المقيد (Restricted biocatalyst). وتتحرر المواد الأيضية والنواتج إلى المائع ليتم طرحها مع المائع فيما بعد إلى خارج المفاعل. قد يكون اتجاه سريان (Flow) المائع إلى الأعلى أو الأسفل، ولكن السريان نحو الأسفل بتأثير الجاذبية هو الشائع. أما إذا كان سريان المائع باتجاه أعلى المهد، فيجب أن تكون السرعة القصوى في هذه الحالة محددة، ويجب أن لا تتجاوز السرعة الدنيا للتسييل (Minimum fluidization velocity) وإلا فإن المهد نفسه سوف يسيل. يحدد عمق المهد بعدة عوامل، من ضمنها الكثافة وقابلية المواد الصلبة على الانضغاط والحاجة إلى حدٍّ أدنى معين للمواد الغذائية المهمة مثل الأكسجين خلال العمق الكامل للمهد. ومعدل السريان المطلوب عند انخفاض معين بالضغط. بالنسبة إلى حجم ضائع (Void volume) معين (أي القص الذي يمثل الحجم الخالي من المواد الصلبة في المهد) فإن معدل السريان المدفوع بالجاذبية عبر المهد يتناقص كلما زاد عمق المهد. مع نزول المائع عبر المهد يتناقص تركيز المغذيات في حين يزداد تركيز المواد الأيضية والنواتج (Biproducts) خلال ذلك. وعليه فإن بيئة المهد المحشو ليست متجانسة، إلا أنه بالإمكان التقليل من الاختلاف بالتركيز على طول عمق المهد من خلال زيادة معدل السريان. يمكن كذلك حدوث تدرج في الرقم الهيدروجيني إذا كان التفاعل مستهلكاً أو منتجاً للـــ H^+ أو OH^-. وبسبب رداءة الخلط فإن السيطرة على الرقم الهيدروجيني من خلال إضافة حمض أو قاعدة يكون مستحيلاً تقريباً. إن المهود التي تحتوي على حجم ضائع كبير تسمح عادة بسرعة سريان أكبر عبرهم، إلا أن تركيز الحفاز الحيوي في حجم مهد معين يتناقص بزيادة الحجم

الضائع. إذا كانت الحشوة (المواد الصلبة الساندة للمحفز الحيوي) قابلة للانضغاط فإن وزنها قد يضغط المهد إلا إذا تم الحفاظ على ارتفاع الحشوة منخفضاً. هذا ويكون السريان صعباً في المهد المضغوط بسبب اختزال الحجم الضائع. تستخدم المهود المحشوّة بشكل كبير كمفاعلات أنزيمات مقيدة (Immobilised enzyme). إن هذه المفاعلات جذابة للاستخدام، خصوصاً في التفاعلات التي تثبط بواسطة الناتج. تختلف تراكيز الناتج، من القيمة المنخفضة عند المدخل للمهد إلى القيمة العالية عند المخرج، وبهذا فإن جزءاً فقط من الحفاز الحيوي سيتعرض إلى مستويات تثبيط عالية من الناتج.

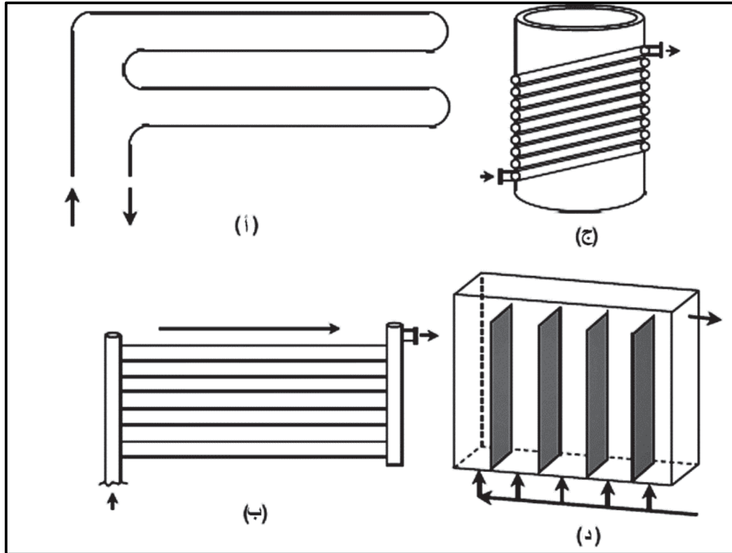
6.2.7 المفاعلات الضوئية Photobioreactors

تستخدم المفاعلات الضوئية لإنشاء مزارع التخليق الضوئي (Photosynthetic culture) للطحالب المجهرية والسيانوبكتريا لإنتاج مواد مثل استازانتين (Astaxanthin) وبيتا – كاروتين (β - carotene). تتطلب مزارع التخليق الضوئي وجود ضوء الشمس أو إضاءة اصطناعية. إن الإضاءة الاصطناعية عالية التكاليف عادة، ويبدو أن استخدام المفاعلات الضوئية خارج المختبر واعد فقط في حالات الإنتاج الضخم (Large scale prod). تستخدم البرك والسواقي المفتوحة (Open ponds) غالباً لإنماء الطحالب المجهرية، وبالأخص في معاملات مياه الصرف الصحي. عند الحاجة إلى إنشاء مزرعة أحادية الخمج (Monoseptic) يجب استعمال مفاعلات حيوية ضوئية مغلقة بالكامل. وبما أن هذه المفاعلات تحتاج إلى الضوء، فإن عملية التركيب الضوئي (Photosynthesis) تحدث عادة في أعماق ضحلة نسبياً. وعموماً، لا يتجاوز عمق برك الطحالب 0.15 m. علماً أن الإضاءة الشديدة تؤدي إلى التثبيط الضوئي (Photoinhibition)، وهي حالة يزداد فيها معدل التركيب الضوئي إذا ما اختزلت شدة الإضاءة قليلاً. وبازدياد عدد الخلايا في المزرعة، يعمل التضليل الذاتي للخلايا في المزرعة، على تحديد نفوذية الضوء. علاوة على حاجتها إلى الضوء فإن خلايا الطحالب التي تقوم بعملية التركيب الضوئي تحتاج إلى مصدر كربون، عادة على شكل ثاني أوكسيد الكربون.

تتكون المفاعلات الحيوية الضوئية المغلقة، التي تستخدم لإنشاء المزارع أحادية الخمج، من صفوف من الأنابيب الشفافة المصنوعة من الزجاج أو، وهو الأكثر شيوعاً، من بلاستك شفاف. تصف الأنابيب إما بشكل أفقي، أو ترتب عمودياً على شكل درج، وكما هو موضح في الشكل 7.7.



الشكل 6.7: مفاعل المهد المحشو.



الشكل 7.7: مفاعل حيوي ضوئي للمزارع الأحادية (monoculture) (أ) أنشوطة أنبوبية مستمرة. (ب) مستقبلة شمسية مصنوعة من أنابيب متوازية متعددة.
(ج) أنشوطة أنبوبية ملفوفة حلزونياً و(د) تشكيلة اللوح المسطح يمكن للتشكيلتين (أ) و (ب) أن تربطا بشكل عمودي أو موازٍ للأرض.

كما يمكن استعمال أنبوب واحد مستمر وعلى شكل أنشوطة، أو أنبوب حلزوني ملفوف حول أسطوانة عمودية. إضافة إلى الأنابيب يمكن استخدام ألواح رقيقة مسطحة أو مائلة في عمليات الإنتاج الصغيرة. تشكل صفوف الأنابيب أو الألواح المسطحة المستقبل الضوئي (Solar receiver) في المفاعل. يتم إمرار المزرعة خلال المستقبل الضوئي باستخدام طرائق مختلفة. تتضمن مضخات نابذة (Centrifugal) أو مضخات الإحلال الموجب الأحادية (Positive displacement)، أو اللوالب الأرخميدية (Airchimedean screws)، أو وسائل الرفع الهوائي (Airlift devices). تعمل موائع الرفع الهوائي بصورة جيدة وهي لا تحتوي على أجزاء ميكانيكية، ويسهل تشغيلها تحت الظروف المعقمة، وهي ملائمة للتطبيقات التي تحتوي على مزارع حساسة لعملية القص (Shear sensitive).

إن سريان المائع في أنبوب أو لوحة المستقبل الضوئي يجب أن يكون مضطرباً (Turbulent) بشكل كافٍ لكي يساعد على استمرار حركة الخلايا من الأجزاء العميقة البعيدة عن الضوء إلى الأماكن التي تكون أكثر قرباً من الجدران. يتوجب أن تكون السرعة في كل الأنحاء كافة لتمنع ترسيب الخلايا. نمطياً، يتطلب أن تكون السرعة الخطيّة في أنابيب المستقبلة بين 0.3 – 0.5 متر/ثانية. بما أن هناك حاجة إلى الحفاظ على نفاذية مناسبة لأشعة الشمس، فإن عملية زيادة الإضاءة في أنبوب المستقبل الضوئي لا يمكن أن تتم بمجرد زيادة قطره. عموماً، يجب أن لا يزيد قطر الأنبوب على 6 سم، ويعتمد نفاذ الضوء على كثافة الكتلة الحيوية، وعلى شكل الخلايا، وعلى وجود الصبغات، وعلى خصائص امتصاص الوسط الزرعي الخالي من الخلايا.

3.7 الصفات التصميمية للمفاعل الحيوي Bioreactor design features

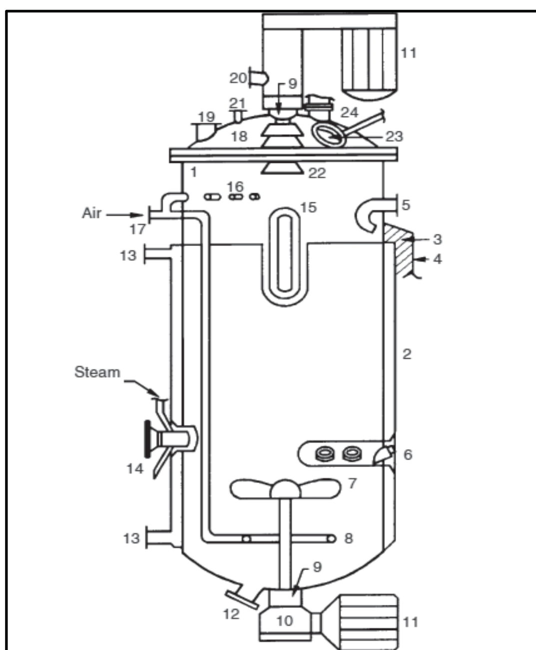
بغضّ النظر عن شكل المفاعل المستعمل، فإنه يجب أن يزود بصفات عامة معينة. إن بعضاً من هذه الصفات الرئيسية موضحة بالشكل 8.7. يزود حوض المفاعل بنافذة زجاجية للرؤيا ومنافذ جانبية لمتحسسات الرقم الهيدروجيني (pH)، ودرجة الحرارة، وتركيز الأكسجين المذاب، كمتطلبات دنيا (انظر كذلك الفصل

الفصل العاشر). غالباً ما يتم استخدام متحسسات قابلة للسحب (Retractable) حيث يمكن استبدالها أثناء عملية التخمير. ويزود الوعاء (Vessel) كذلك بتوصيلات لإضافة الحمض والقاعدة (للسيطرة على الرقم الهيدروجيني)، وللمواد المانعة للرغوة، ولعملية التلقيح (Inoculation). تقع هذه التوصيلات عادة فوق مستوى السائل في وعاء المفاعل. أما الهواء وغيره من الغازات مثل ثاني أوكسيد الكربون، والأمونيا (للسيطرة على الرقم الهيدروجيني) فإنها تضاف من خلال مرشة (Sparger) تقع قرب قاعدة الوعاء، كما يزود قضيب الخفاقات بسدادات ميكانيكية مفردة أو مزدوجة معقمة بالبخار.

السدادات المزدوجة (Double scals) هي الأكثر تفضيلاً، ولكنها تحتاج إلى عملية تشحيم باستخدام مكثفات بخار باردة ونظيفة. يمكن الاستغناء عن السدادات المزدوجة في حالة استعمال خفاقات ترتبط مغنطيسياً، إذا كانت حدود الشد تسمح بذلك. إن معظم عمليات التخمير هوائية وتحتاج إلى تجهيز مستمر من الهواء المعقم. وعليه فإن المخمر يزود عادة بمجهز للهواء وبأنابيب إفراغ ويكون كلاهما مجهز بمرشحات غاز (Gas filters) يمكن تعقيمها بالبخار. وغالباً ما يستخدم لهذه الغاية مرشحات غشائية من النوع الكاره للماء (Hydrophobic membrane catridge filter). يكون هذا النوع من المرشحات مصمماً لإزالة الدقائق التي يبلغ حجمها 0.45 مايكرومتراً أو حتى 0.1 مايكرومتر. وبهذا فإن السبورات أو الأبواغ (Spores) والكائنات المجهرية الأخرى ستزال من الهواء الداخل والخارج. غالباً ما تحتوي مجاري الغاز على خرطوشتي (Cartridges) مرشح مرتبة على التوالي، حيث تعمل الخرطوشة الأولى على حماية المرشح النهائي. هذا وتتكون نتيجة لعمليتي التهوية والخفق رغوة (Foam)، للسيطرة عليها يتوجب استخدام المواد الكيميائية المضادة للرغوة ومجزّئات الرغوة الميكانيكية (Mechanical foam breaker). تستخدم مجزّئات الرغوة الميكانيكية وحدها عندما يكون وجود المواد الكيميائية المضادة للرغوة غير مقبول، أو إذا كانت هذه المواد تتعارض مع عمليات أسفل المجرى (Downstream processes) مثل عمليات الفصل بواسطة الأغشية، أو الكروماتوغرافيا. يجب كذلك تغليف قضيب مجزّئ الرغوة الميكانيكي العالي السرعة باستخدام سدادات أحكام ميكانيكية مزدوجة.

يصمم المفاعل الحيوي، في معظم الأحيان، بحيث يستطيع تحمل أعلى حد مسموح من الضغط الذي يتراوح بين 377-412 كيلوباسكال (kpa). وعلى الرغم من أن درجة حرارة التعقيم لا تزيد عادة على $121^{\circ}C$ إلا أن حوض المفاعل يصمم عادة لتحمل درجات حرارة أعلى تتراوح بين $150 - 180^{\circ}C$.

كما يصمم الحوض بحيث يكون قادراً على تحمل الفراغ الكامل وإلا فإنه سيتصدع وينهار تبريده بعدعملية التعقيم. يمكن تعقيم المفاعل وهو في مكانه باستخدام بخار مشبع نظيف وبضغط مطلق أدنى يساوي 212 كيلوباسكال. يزود المفاعل كذلك بحماية ضد الضغط العالي، وذلك من خلال استعمال ما يسمى بالقرص المنفجر (Rupture disc) الذي يقع في قمة المفاعل الحيوي. يصنع هذا القرص المنفجر من مادة الغرافيت (Graphite) عادة لأنه لا يكون شقوقاً أو ثقوباً صغيرة من دون أن يتحطم نهائياً. هناك فقرات أخرى موجودة في الصفيحة الرأسية للوعاء مثل فتحات لإضافة الأوساط الزرعية والمغذيات، وكذلك لإدخال المتحسسات (Sensors) (مثل قطب الرغوة) والأجهزة الأخرى (مثل مقياس الضغط).



الشكل 8.7: مفاعل حيوي حوضي مخفوق نموذجي.

يجب أن يحتوي حوض المفاعل على أقل عدد ممكن من المكونات الداخلية، ويجب أن يأخذ التصميم بعين الاعتبار الحاجة إلى إجراء التنظيف والتعقيم للمفاعل وهو في مكانه. يجب أن يكون الحوض خالياً من الجيوب والمكانات التي يمكن للسوائل والمواد الصلبة أن تتجمع فيها. كما أن الانتباه في تصميم بعض الفقرات، التي قد تبدو ثانوية، مثل أخاديد الكازكيت (Gasket) يكون مهماً جداً.

يفضل استخدام قنوات ذات حافات منحنية سهلة التنظيف، ويكون أحياناً استخدام مثل هذه القنوات أساسياً. كما يفضل، وما أمكن ذلك، استخدام عملية اللحام بدلاً من الربط في أعمال وصل جميع الأنابيب. ويجب أن تسمح توصيلات البخار بالإزاحة الكاملة لجميع الجيوب الهوائية في الخزن والأنابيب المرتبطة به. حتى السطح الخارجي للمفاعل الحيوي يجب أن يصمم بنظافة مع انحناءات ناعمة تجنب وجود بروزات خيطية مكشوفة.

يغلّف الحوض بأشكال مختلفة. في غياب المتطلبات الخاصة، يصمم الغلاف بنفس مواصفات الحوض. يغطى الغلاف بعازل مكون من ألياف زجاجية خالية من الكلوريد التي تكون محاطة بالكامل بكفن حافظ، وكما هو موضح بالشكل 8.7. يزود الغلاف بحماية ضد الضغط العالي من خلال صمام أمان يقع على الغلاف أو الأنابيب المرتبطة به. تعتبر مادة الفولاذ غير القابل للصدأ المادة المفضلة في صناعة المفاعلات الحيوية للغالبية العظمي من التطبيقات. يصنع حوض المفاعل عادة من مادة الفولاذ غير القابل للصدأ من نوع 316 L، في حين يستعمل الفولاذ من نوع 304 (أو 304 L)، وهو أقل ثمناً، في صناعة الغلاف وكفن العازل والسطوح الأخرى التي ليس لها اتصال مباشر مع وسط التخمير المائع. تحتوي درجات L للفولاذ غير القابل للصدأ على أقل من 0.03% كربون مما يقلل من تكوين كربيد الكروم (Chromium Carbide) أثناء عملية اللحام، ويقلل كذلك من احتمالية التأكل في منطقة اللحام لاحقاً. أما بالنسة إلى مواقع لحام الأجزاء الداخلية فيجب أن تبرد وتنعم بشكل جيد لتصبح بمستوى السطح الداخلي للحوض.

4.7 اعتبارت تصميمية خاصة Specific design consideration

إن تصميم مفاعل حيوي هو عملية هندسية معقدة. يجب، أول الأمر، اختيار الشكل الأساسي للمفاعل الحيوي المطلوب (لاحظ الفقرة 2.7)، اعتماداً على معرفة متطلبات عملية التخمير المطلوبة. فعلى سبيل المثال، عند الرغبة بالحصول على نمو كثيف لكائن مجهري هوائي في مزرعة مغمورة، فإن التوليفة الأولية المناسبة لهذا الغرض هي مفاعلات أعمدة الفقاعات ومفاعلات الرفع الهوائي والأحواض المخفوقة فقط. ثم هناك عوامل أخرى مثل خصائص سريان الوسط

الزرعي المائع (Rheology)، ولاسيما اللزوجة وقابلية المزرعة على تحمل جهد القص (Shear) ومعدل إنتاج الحرارة الأيضية، ومتطلبات الأكسجين (OD) وقابلية الخلايا على تحمل فترات لاهوائية قصيرة. كل هذه العوامل ستلعب دوراً في تحديد واختيار نوعية المفاعل الحيوي المطلوب. بعد اختيار الشكل المطلوب، يجب إجراء تحاليل هندسية لتقييم قدرة الخفق ومتطلبات التهوية، وذلك:

1- لتوفير متطلبات الحاجة إلى الأكسجين (انظر الفصل الثامن).
2- للوفاء بقيود مدة الخلط بحيث يمكن الحصول على تجانس مقبول للمواد الغذائية والأكسجين الذائب في المفاعل الحيوي.
3- للحصول على مستوى كافٍ من التحريك للحفاظ على الكتلة الحيوية على شكل معلق في المائع ولإزالة الحرارة المتولدة عن عمليات الأيض والخفق (انظر النص 1.4.7)، ولكن على أن لا يكون التحريك شديداً للدرجة التي تؤدي إلى الإضرار بالحفاز الحيوي.

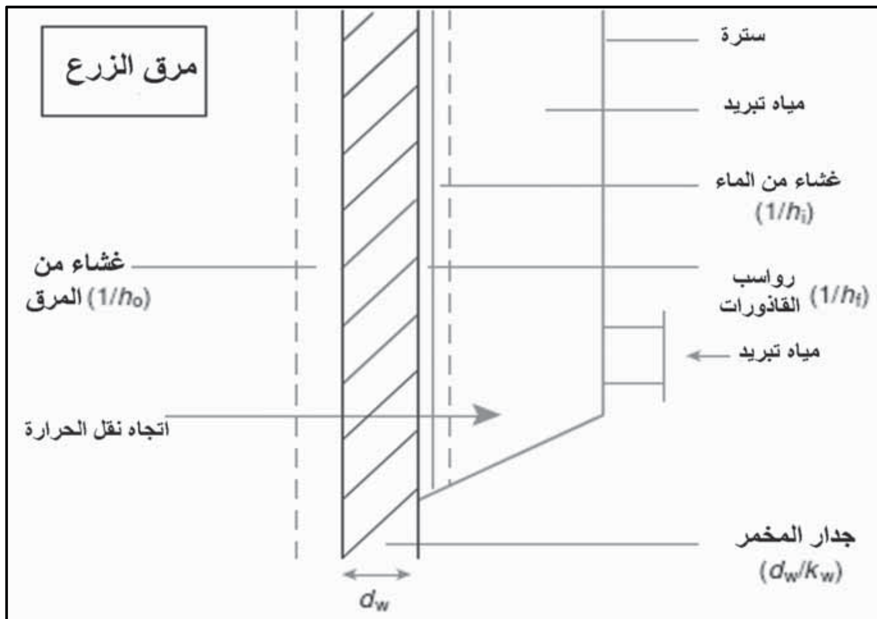
إن تقدير العوامل الأخرى، مثل مقابلية المفاعل الحيوي على نقل الأكسجين وتحديد مدة الخلط، ومعدلات جهد القص، وقابلية التخلص من الحرارة، يتطلب اتباع أساليب مختلفة للأنواع المختلفة من أشكال المفاعلات الحيوية. وسنناقش هنا موضوع التخلص من الحرارة وتقدير معدلات جهد القص فقط كعاملين مهمين في التصميم. أما انتقال الأكسجين فسيناقش في الفصل الثامن.

1.4.7 النقل الحراري Heat transfer

جميع المخمرات تولد حرارة. وتولد المزارع المغمورة عادة بين 3-15 كيلوجول/م^3/ ثانية من الحرارة، ويكون إنتاج الحرارة عالياً، خصوصاً عند نمو الكتلة الحيوية بسرعة أثناء حالات التخمير العالي الكثافة، وكذلك عند استخدام مواد مختزلة للكربون، مثل الهيدروكربونات والميثانول، كمواد أولية. إن معدل توليد الحرارة الأيضية محسوباً بـــ $kj/m^3/s$ هو رقمياً حوالى 12% من معدل استهلاك الأكسجين معبّراً عنه بـــ $mmol/m^3/s$. وتصبح عملية التخلص من الحرارة في الأحواض الكبيرة أكثر صعوبة كلما اقترب معدل توليد الحرارة من $5\ kw/m^3$ (أي $5\ kj/m^3/s$)، وهو ما يقابل معدل استهلاك الأكسجين البالغ حوالى 5

$kg/m^3/h$ (أي $43\ mmol/m^3/s$). إضافة إلى الحرارة الأيضية، فإن التحريك الآلي للوسط الزرعي المائع ينتج حرارة قد تصل إلى $15\ kj/m^3/s$. وفي حالة المخمرات المشغلة بالهواء (Air driven)، فإن جميع الطاقة الداخلة نتيجة لاستعمال الغاز سوف تتبدد لاحقاً على شكل حرارة. وعليه يجب تبريد المخمر لمنع ارتفاع درجة الحرارة التي يمكن أن تحدث ضرراً بالمزرعة.

وبزيادة حجم عملية التخمير، فإن النقل الحراري وليس الانتقال الكتلي للأكسجين سيصبح العامل المحدد في المفاعلات الحيوية، وذلك لأن المساحة السطحية المتاحة للتبريد تقل بزيادة حجم المخمر. يمكن السيطرة على درجة الحرارة بواسطة عمليات التسخين والتبريد من خلال الأغلفة الخارجية والمحلزنات (Coils). يتطلب أحياناً، وبدرجة أقل شيوعاً، إضافة حواجز ثنائية الجدران، أو أنابيب تيار، أو مبادلات حرارية في داخل حوض المخمر لأجل توفير مساحة سطحية كافية للنقل الحراري.



الشكل 9.7: مقاومة النقل الحراري قرب جدار المخمر.

تسري الحرارة، خلال عملية التبريد، من الوسط الزرعي المائع باتجاه ماء التبريد في الغلاف أو محلزن التبريد (انظر الشكل 9.7). يعتمد معدل التخلص من

الحرارة (Q_H) على المساحة السطحية (AH) المتاحة للتبادل الحراري وعلى متوسط اختلاف درجة الحرارة (ΔT)، وبهذا يكون:

$$Q_H = U_H A_H \Delta T \qquad 1.7$$

حيث يمثل U_H معامل النقل الحراري الكلي. يعتمد معامل U_H على معامل النقل الحراري الغشائي للمائع على جانبي الجدار المعدني.

يتأثر معامل النقل الحراري الغشائي بعدة عوامل، من ضمنها:

- كثافة ولزوجة المائع.
- التوصيل الحراري والسعة الحرارية.
- سرعة السريان أو بعض المقاييس الأخرى للتحريك (مثل، القوة الداخلة أو معدل سريان الغاز... إلخ).
- هندسة المفاعل الحيوي.

يمكن تجميع المتغايرات العديدة التي تؤثر في النقل الحراري على شكل أعداد عديمة الأبعاد (Dimentionless numbers) قليلة لأجل تسهيل دراسة ووصف تلك العوامل ذات التأثير الكبير. إن المجاميع التي لها علاقة بالنقل الحراري وديناميكية المائع المقابل (مثل، التحريك) هي التالية:

$$\text{Nu (Nusselt number)} = \frac{\text{total heat transfer}}{\text{conductive heat transfer}} = \frac{h_o d}{k_T} \qquad 2.7$$

$$\text{Pr (Prandtl number)} = \frac{\text{momentum diffusivity}}{\text{thermal diffusivity}} = \frac{C_p \mu_L}{K_T} \qquad 3.7$$

عدد براندتيل

$$\text{Re (Reynolds number)} = \frac{\text{inertial force}}{\text{viscous force}} = \frac{\rho_L U_L d}{\mu_L} \qquad 4.7$$

عدد رينولدز

$$\text{Gr (Grashof number)} = \frac{\text{gravitation force}}{\text{viscous force}} = \frac{d^3 \rho_L g}{\Delta T \beta \mu_L^2} \qquad 5.7$$

عدد غراشوف

يمثل d، في هذه المعاملات، الطول المميز (مثل قطر الأنبوب، أو الخفاق). تظهر هذه المجاميع عديمة الأبعاد، الأهمية النسبية للعوامل المختلفة التي

تؤثر في حالة معينة. تخبرنا قيمة رقم ناسيلت (Nusselt number) عن المقادير النسبية للنقل الحراري الكلي، وعن تلك التي انتقلت بالتوصل فقط. أما رقم غراشوف فهو مهم في الحالات التي يكون فيها السريان ناتجاً من الاختلافات في الكثافة، التي قد تكون نفسها قد تولدت بواسطة التدرج الحراري (ولهذا يتواجد ΔTB في رقم غراشوف). يستخدم رقم رينولدز في وصف حركة المائع في الحالات التي يكون فيها الانتقال المجبر هو السائد.

إن المعادلات التي تحسب مقاومة الأغشية للترسبات (Fouling flims) (أوساخ تترسب على الجدران الصلبة وعلى الحبيبات) وأغشية سوائل التبريد والتسخين موضحة في كتب هندسة العمليات المتوفرة أصلاً. العلاقات المناسبة لتقدير معامل النقل الحراري (Heat transfer coefficient) (h_0) لأغشية المائع أو الوسط الزرعي المائع في الأشكال المختلفة للمفاعلات الحيوية ملخصة في الجدول 1.7.

لاحظ أن العلاقات الموضحة في الجدول هي للأحواض المخفوقة المستخدمة لرقم رينولدز المعرفّة بواسطة سرعة طرف الخفاقة (Tip speed). تحتاج العلاقات المدرجة في الجدول 1.7، في بعض الحالات، إلى معرفة قابلية التوصيل الحراري (k_T) والسعة الحرارية المتخصصة (c_p) للوسط الزرعي لتخمين قيمة معامل النقل الحراري. وفي معظم الأوساط الزرعية السائلة تقترب قيم هذه العوامل من قيمها في الماء. وعموماً يزداد معامل النقل الحراري للغشاء مع:

- زيادة الاضطراب.
- زيادة معدل السريان.
- زيادة قوة الخفق.

في حين تتناقص قيمة المعامل مع:

- زيادة لزوجة الوسط الزرعي المائع.

تؤثر هندسة المفاعل الحيوي في معامل النقل الحراري الغشائي عن طريق التأثير في درجة الاضطراب أو المقاييس المتعلقة الأخرى مثل معدل تدوير السائل

في أحواض الرفع الهوائي. أما في أعمدة الفقاعات فإن المعامل الغشائي لا يعتمد على قطر العمود ما دام قطر العمود يزيد على حوالى 0.1 m. وكذلك في أعمدة الفقاعات، قيمة h_0 لا تتأثر بارتفاع المائع الخالي من الغاز، وتزداد قيمة h_0 بزيادة سرعة الغاز السطحية أو القوة الداخلة، ولكن فقط إلى حد سرعة 0.1 m/s تقريباً. علاوة على ذلك فإن أعمدة الفقاعات والأحواض المخفوقة تنتج قيم معامل حراري متشابهة في حالة استخدام قوة داخلة متخصصة متماثلة.

الجدول 7-1 العلاقات الرياضية الخاصة بمعامل النقل الحراري لغشاء المرق السطحي، في الأشكال المختلفة للمفاعلات الحيوية

شكل المفاعل الحيوي	العلاقة	الامداء
ملفات الأحواض المخفوقة	$\frac{h_o d_T}{k_T}\left(\frac{\mu_{Lw}}{\mu_L}\right)^{0.14} = 0.87\left(\frac{d_i^2 N \rho_L}{\mu_L}\right)^{0.62}\left(\frac{C_p \mu_L}{k_T}\right)^{\frac{1}{3}}$	لتبريد الملفات: والموائع النيوتونية
ملفات الأحواض المغلقة	$\frac{h_o d_T}{k_T}\left(\frac{\mu_{Lw}}{\mu_L}\right)^{0.14} = 0.36\left(\frac{d_i^2 N \rho_L}{\mu_L}\right)^{0.67}\left(\frac{C_p \mu_L}{k_T}\right)^{\frac{1}{3}}$	للاوعية المغلفة: وللموائع النيوتونية
أعمدة الفقاعات	$h_o = 9391 U_G^{0.25}\left(\frac{\mu_w}{\mu_L}\right)^{0.35}$	مَرَق نيوتوني $10^{-3} < \mu_L\ (kg\ m^{-1}\ s^{-1}) < 5 \times 10^{-2}; U_g \leqslant 0.1 m\ s^{-1}; 0.1 \leqslant d_T\ (m) \leqslant 1$
	$\frac{h_o}{\rho_L C_p U_G} = 0.1\left[\frac{U_G^3 \rho_L}{\mu_L g}\left(\frac{\mu_L C_p}{k_T}\right)^2\right]^{\frac{1}{4}}$	مرق نيوتوني
أوعية الرفع الهوائي لنشر بواسطة أنبوب سغط	$h_o = 8710 U_{Gr}^{0.22}\left(\frac{A_r}{A_d}\right)^{0.25}\left(\frac{C_p \mu_L}{k_T}\right)^{-0.5}$	مرق نيوتوني $\mu_L = (0.78 - 5.27) \times 10^{-3}\ kg\ m^{-1}\ s^{-1}$; $0.008 \leqslant U_{Gr} \leqslant 0.16\ m\ s^{-1}$; $0.25 \leqslant A_r/A_d \leq 1.20$. The h_o varied from 600 to 2400 $W\ m^{-2}\ °C^{-1}$
النشر بواسطة حلقة	$h_o = 13340\left(1 + \frac{A_d}{A_r}\right)^{0.7} U_G^{0.275}$	هواء - ماء, $0.01 \leqslant U_G \leqslant 0.04\ m\ s^{-1}$; $A_d/A_r = 0.242$ and 0.452
المهود المسالة (غاز - سائل - صلب)	$\frac{h_o d_p \varepsilon_L}{k_T(1-\varepsilon_L)} = 0.044\left[\frac{d_p U_L \rho_L}{\mu_L(1-\varepsilon_L)}\frac{C_p \mu_L}{k_L}\right]^{0.78} + 2\left(\frac{U_G^2}{g d_p}\right)^{0.11}$	كافة الخواص تعود إلى الحالة السائلة

إن المعلومات المتوفرة عن النقل الحراري في مفاعلات الرفع الهوائي قليلة. ولكن يمكن استخدام المعادلات التي طورت للاستخدام مع أعمدة الفقاعات (الجدول 1.7) وذلك للحصول على تقدير لقيم h_0 في أحواض الرفع الهوائي عندما تكون معدلات تدوير المائع الحفاز قليلة. تحت ظروف أخرى، يمكن أن تكون قيمة المعامل في مفاعلات الرفع الهوائي أعلى بأكثر من مرتين مما هو عليه في مفاعلات أعمدة الفقاعات. وعندما لا تزيد سرعة السريان على 0.015 m/s، فإن معامل النقل الحراري الغشائي يعتمد بشكل كبير على سرعة المائع. علماً أنه في حالة السوائل ذات السرعات العالية فإن قيمة h0 تزداد بزيادة سرعة المائع، وكما يلي:

$$h_o \propto U_L^{1/4} \quad [0.015 \leqslant U_L(\mathrm{m\ s^{-1}}) \leqslant 0.139] \qquad 6.7$$

تتوفر كميات كبيرة من المعلومات عن النقل الحراري في السريان العمودي ثنائي الطور (Vertical two – phases flow). وربما يمكن تطبيق بعض هذه المعلومات على مفاعلات الرفع الهوائي على شرط أن تكون خصائص المائع وقابلية حجز الغاز (Gas hold – up) والسرعات النسبية للطورين متماثلة في مفاعلي الرفع الهوائي والسريان العمودي ثنائي الطور. إن مايسيليا الفطريات هي مثل المواد الصلبة تزيد أو تقلل من النقل الحراري اعتماداً على الظروف الهيدروداينميكية في مفاعل الرفع الهوائي. أما بالنسبة إلى عمليات التخمير التي تستعمل فيها البكتريا أو الخمائر فإن القابلية على تحمل السيطرة الحرارية تكون محدودة جداً، بينما مزارع الخلايا الحيوانية تتطلب نظاماً أشد من ذلك للسيطرة على الحرارة. نموذجياً، تزرع الخلايا بدرجة (37˚C ± 0.2˚C). تولد الخلايا النامية قليلاً من الحرارة كما تكون الحرارة المتولدة عن الخفق قليلة كذلك. إضافة إلى ذلك، فإن القوام المائي، تقريباً، للوسط الزرعي المائع يعني سهولة النقل الحراري نسبياً، علماً أن الفرق بدرجة الحرارة بين سطح التسخين والتبريد، والوسط الزرعي المائع يجب أن يبقى صغيراً وإلا تعرضت الخلايا للضرر.

2.4.7 تأثير القص في المزرعة Shear effect in culture

إن جهد القص يتعلق بمعدل القص، كما أن القوى الهيدروداينميكية الأخرى في المفاعل الحيوي يمكن أن تلحق أضراراً في الخلايا الهشة وفي خيوط (Flocs)

وحبيبات الحفاز الحيوي والكائنات متعددة الخلايا مثل الديدان الخيطية (Nematodes). وعليه، يجب الأخذ بعين الاعتبار عند تصميم المفاعل، تحديد مستوى القص والقوى المضرة الأخرى. وإن معدل القص هو مقياس للتغايرات المكانية (Spatial variation) للسرعات الموضعية في المائع. إن الضرر الذي يلحق بالخلايا في المائع المتحرك يرتبط أحياناً بمقدار معدل القص السائد. إلا أن معدل القص في البيئات المضطربة نسبياً في معظم المفاعلات الحيوية لا يمكن تحديده أو قياسه بسهولة. علاوة على ذلك، فإن معدل القص يختلف باختلاف المواضع في الحوض. ولقد أجريت محاولات لتوصيف متوسط معدل القص، أو معدل القص الأقصى في الأنواع المختلفة من المفاعلات الحيوية. يعرف متوسط معدل القص في أعمدة الفقاعات على أنه وظيفة السرعة السطحية للغاز، وكما يلي:

$$\gamma = kU_G^a \qquad (7.7)$$

حيث يكون العامل a مساوياً إلى 1.0 في معظم الحالات، ولكن سجلت قيم مختلفة لـــ K مثل 1000 و 2800 و 5000 /m... إلخ. وطبقت المعادلة (7-7) كذلك في مفاعلات الرفع الهوائي وباستخدام السرعة السطحية للغاز في منطقة الصاعد (Riser zone) كعامل علاقة، علماً أن هذا الاستخدام غير صحيح. وأن المعادلة المناسبة لمفاعلات الرفع الهوائي هي:

$$\gamma = \frac{kU_{Gr}}{1+(A_d/A_r)} \qquad 8.7$$

اعتماداً على قيمة k، فإن المعادلات مثل (7.7) و (8.7) تنتج قيم معدل قص مختلفة كثيراً. علاوة على ذلك، فإن المعادلات لا تأخذ بعين الاعتبار كثافة ولزوجة المائع. علماً بأن كلا هذين العاملين يؤثران في معدل القص.

يمكن حساب متوسط معدل القص في المخمرات الخفوقة، كما في المعادلة التالية:

$$\gamma = k_i\left(\frac{4n}{3n+1}\right)^{n/n-1} N \qquad 9.7$$

تمثل n معامل السريان (Flow index) للمائع وهي مساوية لــ 1050 في السوائل النيوتينية مثل الماء ومحلول الجلوكوز الكثيف. إن قيم k_i النموذجية هي:

13-11 لتوربينات القرص سداسي الشفرة.

13-10 للخفاقات المجدافية.

10-0 للدافعات، والدواسر.

30 تقريباً للخفاقات ذات الشريط الحلزوني.

يمكن تحويل معدل القص إلى عامل يدعى جهد القص (τ) حيث:

$$\tau = \gamma \mu_L \qquad 10.7$$

يمكن استخدام طريقة أخرى لمعرفة فيما إذا كان الاضطراب في المائع يمكن أن يسبب أضراراً للحفاز الحيوي المعلق. تستند هذه الطريقة إلى مقارنة أبعاد الخلية أو خيوط الحفاز الحيوي مع مقياس الطول (Length scale) لدوامات المائع (Fluid eddies).

يعتمد متوسط الطول (l) لدوامات المائع (Fluid eddies) على معدل تبدد الطاقة لوحدة كتلة المائع في المفاعل الحيوي، بهذا فإن:

$$\ell = \left(\frac{\mu_L}{\rho_L}\right)^{3/4} E^{-1/4} \qquad 11.7$$

تتبدد، في معظم الحالات، جميع الطاقة الداخلة إلى المائع في دوامات المائع وإن E تساوي معدل إدخال الطاقة. إن الطرق المستخدمة في حساب معدل إدخال الطاقة في الأنواع الرئيسية للمفاعلات الحيوية موضحة في الإطار 1.7. تستعمل المعادلة (11.7) في السوائل ذات الاضطراب موحد الخواص (Isotropically turbulent fluid)، أي المائع الذي يكون فيه حجم الدوامات الأولية الناتجة من الآليات المولدة للاضطراب أكبر ألف مرة أو أكثر مقارنة بحجم الدوامات المجهرية الناتجة من تبدد الطاقة. يحسب حجم الداومات المجهرية باستخدام المعادلة (11.7). غالباً ما يكون مقياس الطول للدوامات الأولية مقارباً لعرض شفرة الخفاق أو قطر الخفاق في الأحواض المخفوقة. أما بالنسبة إلى مفاعلات

أعمدة الفقاعات والرفع الهوائي، فإن مقياس الطول للدوامات الأولية يكون مقارباً لقطر العمود (أو الأنبوب الصاعد) أو قطر الفقاعة الصادرة عن ناشر الغاز. عموماً، إذا كانت أبعاد حبيبات الحفاز الحيوي أصغر بكثير من الطول المحسوب (l) للداومات المجهرية، فإن هذه الحبيات ستنتقل وببساطة داخل الحوض بواسطة دوامة المائع وسوف لا تجابه أي قوى مخلخلة. أما إذا كان حجم الحبيبات أكبر من مقياس الطول للدوامة فإنها ستجابه ضغطاً تفاضلياً على سطوحها، وإذا لم تكن هذه الحبيبات قوية بالدرجة الكافية فإنها يمكن أن تتحطم بتأثير القوى الناتجة.

علاوة على الاضطراب في المائع، إلا أن هناك ظواهر أخرى في المفاعل الحيوي يمكن أن تسبب أضراراً. من ضمن هذه الظواهر، التصادمات بين الحبيبات ومع الجدران، والسطوح الساكنة الأخرى ومع الخفاق، وكذلك مع قوى القص المرتبطة بانفجار الفقاعات عند سطح المائع، وظواهر أخرى متعلقة باندماج وتحطم الفقاعات وتكوين الفقاعات عند ناشر الغاز. يمكن تقليل تأثيرات معدل القص بين السطوح حول الفقاعات الصاعدة وتلك الناتجة من انفجار الفقاعات عند السطح عن طريق إضافة عوامل مقللة للشد السطحي غير أيونية (Non-ionic surfactant) إلى الوسط الزرعي. تعمل هذه المواد على تقليل التصاق الخلايا الحيوانية بالفقاعات، وبذلك، فإن قليلاً من الخلايا فقط سيعاني ظاهرة القص بين السطوح والانفجار عند سطح المائع.

عند استخدام مزارع الحاملات المجهرية (Microcarriers) للخلايا الحيوانية، تستعمل حاملات كروية بشكل دقائق صغيرة جداً قد يبلغ قطرها 200μm. تبقى هذه الحاملات معلقة في المائع الزرعي لإسناد التصاق الخلايا على سطوحها. تحت الظروف المستخدمة في هذا النوع من المزارع، يكون احتمال اصطدام الدقائق داخل المائع قليلاً جداً، فيما يكون حجم هذه الدقائق في أنظمة مزارع الحاملات المجهرية أصغر، أو مشابهة إلى حجم الحاملات. لذلك، قد تتعرض الخلايا الملتصقة إلى اضطراب يسبب لها الضرر. هذا وتكون الخلايا الحيوانية حرة التعليق صغيرة فلا تتعرض للضرر بسبب مستويات اضطراب المائع.

الإطار 1.7 دخل الطاقة في المفاعلات الحيوية

يختلف احتساب دخل الطاقة في كل وحدة كتلة للمانع اعتماداً على نوع المفاعل الحيوي المستخدم، وكما هو مبين أدناه:

أعمدة الفقاعات

$$E = gU_G$$

حيث أن g التسارع التثاقلي (gravitational acceleration)

$$E = \frac{gU_{Gr}}{I + (A_d/A_r)}$$

حيث أن A_d و A_b تمثلان مساحات المقطع العرضية للنازل والصاعد على التوالي.

الخزانات المخفوقة

(1) السريان الرقائقي (Luminar flow)

يكون السريان الرقائقي أو الصفائحي في الخزانات المخفوقة عندما يقل رقم رينولدز للخفاق (Re_i) عن 10.

يمكن حساب قيمة (Re_i) من المعادلة:

$$Re_i = \frac{\rho_L N d_i^2}{\mu_L}$$

يعتمد رقم الخفاق (Po) في السريان الرقائقي على رقم رينولدز للخفاق، وكما يلي:

$$Po = cRe_i^{-1}$$

حيث تكون قيمة الثابت، حوالي (c ~ 100) (في حالة التوربين ذي القرص سداسي الشفرة)، أو حوالي 40 (في حالة الداسر). بما أن دخل القدرة (power input) ورقم القوة يساوي ($P/P_L N^3 d_i^5$)، يمكن احتساب دخل القدرة. وتكون فيه دخل القدرة عادة أقل بوجود التهوية. تحسب قدرة الغاز (PG) باستخدام قيمة P المحسوبة سابقاً في المعادلة التالية:

$$P_G = 0.72 \left(\frac{P^2 N d_i^3}{Q^{0.56}}\right)^{0.45}$$

حيث تمثل Q معدل التهوية الحجمي. الآن يمكن الحصول على E كالتالي:

$$E = \frac{P_G}{\rho_L V_L}$$

(2) السريان العاصف

يكون السريان عاصفاً في الأحواض المخفوقة عندما تكون $Re_i > 10^4$. ويكون رقم القدرة رقماً ثابتاً (constant) وهو يعتمد على هندسة الخفاق. بعض القيم الثابتة لـــ Po هي: 0.32 (للداسر)، 1.70 (للمجداف بشفرتين)، و6.3 (للتوربين القرصي ذي الست شفرات)، أو 1.0 (للخفاق prochem^R ذي الشفرات الخمس). يمكن احتساب دخل القدرة غير المعاملة بالهواء P باستخدام القيمة الثابتة لرقم القدرة. يمكن الآن احتساب قيم P_G و E كما هو موضح بالسريان الرقائقي.

أما الخلايا الحيوانية المعلقة بصورة حرّة في المائع فتكون عادة أصغر بكثير من أن تتضرر بمستويات عصف المائع المستخدمة عادة في مفاعلات مزارع الخلايا. تكون مستويات جهد القص في مزارع الحاملات المجهرية منخفضة جداً، وقد تصل إلى $0.25\ Nm^{-2}$، وبهذا فإنها قد تؤثر في عملية الارتباط الأولى للخلايا بسطوح الحاملات المجهرية.

5.7 قرءات إضافية Further reading

Chisti, Y. "Animal-cell Damage in Sparged Bioreactors." *Trends in Biotechnology*: vol. 18 (2000), pp. 420 – 432.

Chisti, Y and M. Moo-Young. "Fermentation Technology, Bioprocessing, Scale-up and Manufacture." in: V. Moses, R.E Cape and D.G. Springyham, eds., *Biotechnology: The Science and the Business*. 2nd ed. New York: Harwood Academic, 1999, pp. 177-222.

Doran, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, 1995.

Grima, E. M., Fernández, F. G. A., Camacho, F. G. and Chisti, Y. Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, and Scale-up. *Journal of Biotechnology*: vol. 70 (1999), pp. 231-247.

Lydersen, B. K., N. A. D'Elia, and K. L. Nelson (eds.). *Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities*. New York: John Wiley and Sons, 1994.

الفصل الثامن

انتقال الكتلة

Mass Transfer

هنك نورمان — Henk J. Noorman

د.س.م. أنتي انفكتف، هولندا — DSm Anti – Infectives, The Nether lands

التسمية — Nomenclature

a	مساحة السطح البيني لوحدة حجم المائع (m^{-1})
ā	مساحة السطح البيني لوحدة الحجم الكلي للتفاعل (غاز زائد مائع) (m^{-1})
c	التركيز في طور المائع ($molm^{-3}$)
C_i	التركيز في الجانب المائع للوصلة ($molm^{-3}$)
C*	تركيز التشبع (=التوازن) في طور المائع (P/H =) ($mol\ m^{-3}$)
Cx	تركيز الكتلة الحيوية ($kg\ m^{-3}$)
d	سمك غشاء المائع (m)
D	معامل الانتشار أو الانتشارية الكفوءة ($m^2\ S^{-1}$)
D	قطر الخفاق الدافع (m)
H	معامل هنري ($bar\ m^3\ mol^{-1}$)
Hv	ارتفاع المائع (m)
J	الدفق الكتلي المولاري عبر غشاء الغاز ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
J_g	الدفق الكتلي المولاري عبر غشاء الغاز ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)

J_i	**الدفق الكتلي المولاري عبر غشاء سائل ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)**
k	**معامل النقل الكتلي (ms^{-1})**
K_g	**معامل النقل الكتلي لغشاء الغاز (ms^{-1})**
K_i	**معامل النقل الكتالي لغشاء المائع (ms^{-1})**
K_{ia}	**معامل النقل الكتلي الحجمي (s^{-1})**
K	**معامل النقل الكتلي العام (ms^{-1})**
K	**دليل القوام (conisitency)**
n	**دليل قانون القوة**
N	**سرعة دوران الخفاق (s^{-1})**
OTR	**معدل نقل الوكسجين (= Ja للأكسجين) ($mol\ m^{-3}\ s^{-1}$)**
P	**الضغط (Nm^{-2} = bar)**
P_o	**الضغط المرجعي (= 1 bar) (bar)**
P_i	**الضغط عند الجانب الغازي للوصلة (bar)**
P_{in}	**ضغط الغاز الداخل (bar)**
P_{out}	**ضغط الغاز الخارج (bar)**
P	**القوة الداخلة (W)**
P_s	**القوة الداخلة بواسطة الخفاق (W)**
q	**معدل الاستهلاك ($mol\ m^{-3}\ s^{-1}$)**
t	**الزمن (s)**
Tv	**قطر الحوض (m)**
x	**المسافة (m)**
Vg	**سرعة الغاز السطحية (ms^{-1})**
V	**الحجم (m^3)**
Vg	**حجم الغاز (m^3)**
V_l	**حجم المائع (m^3)**
α	**دليل قانون القوة**

متوسط معدل القص (s^{-1})

ε	**القص المحجوز أو الضائع**
μ	**اللزوجة الديناميكية ($kgm^{-1}\ s^{-1}$)**
μ_o	**اللزوجة الديناميكية المرجعية ($kgm^{-1}\ s^{-1}$)**
$\rho 1$	**كثافة طور المائع (kgm^{-3})**
P_o	**رقم قوة الخفاق**
R_e	**رقم رينولدز (Reynolds)**

1.8 النقل الكتلي في المفاعلات الحيوية Mass transfer in bioreactors

1.1.8 المقدمة Introduction

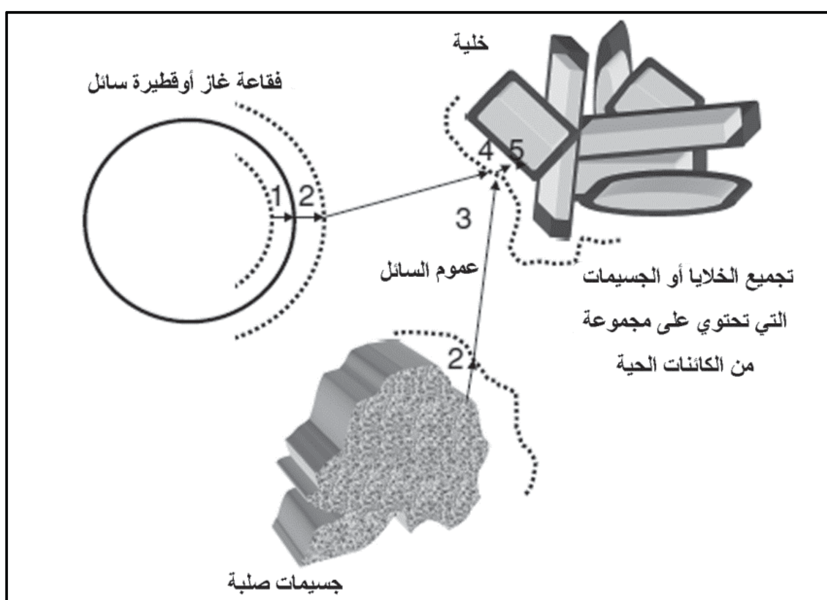
تستهلك المواد الأولية في علمليات التفاعلات الحيوية لتكوين نواتج بواسطة الكائنات المجهرية أو بواسطة أجزاء محفزة منها مثل الأنزيمات. إن المواد الأولية النموذجية للكائنات الحية هي مصادر الكربون مثل السكر والدهون، ومصادر النتروجين مثل الأمونيا والأحماض الأمينية، ومستقبلات الإلكترونات مثل الأكسجين. أما النواتج فيمكن أن تكون مختلف أنواع المركبات العضوية، تدرجاً من الكتلة الحيوية إلى ثاني أوكسيد الكربون. لأجل الحصول على معدل تفاعل أمثل، يجب على الباحث الأكاديمي أو مهندس العملية التصنيعية أن يضمن انتقال المادة الأولية إلى الأنزيم أو سطح الخلية (أو موقع التفاعل داخل الخلية) وكذلك إزالة النواتج بعيداً عن الأنزيم أو الكائن الحي وبالسرعة الممكنة، ويفضل أن تكون هذه العملية غير محددة بمعدل. تشمل عملية الانتقال هذه عادة سلسلة من خطوات النقل الكتلي، وكما موضح بالشكل 1.8.

إن أبطأ هذه الخطوات هي التي ستحدد معدل النقل الكتلي العمومي، ويجب مقارنة قيمتها بقيمة خطوة أبطأ تفاعل حركي لكي نعرف فيما إذا كان النقل الكتلي سيؤثر في أداء العملية ككل أم لا. سيتم تركيز الانتباه في هذا الفصل على التفاعلات التي تشمل خلايا كاملة. أما في عمليات التحولات الحيوية الأنزيمية، فتكون الخلايا غائبة، وبالتالي هناك عدد أقل من خطوات النقل الكتلي، ولكن يمكن تطبيق نفس المفاهيم عليها.

2.8 خطوات النقل الكتلي Mass transfer steps

1.2.8 تأثير محددات النقل Effect of transfer limitations

إذا كانت إحدى خطوات النقل الكتلي أبطأ من خطوة التفاعل الحركي الرئيسية، فإنها ستحدد الفعاليات الأيضية للكائنات المجهرية، التي يعبر عنها عادة كاختزال في تكوين الناتج المرغوب فيه من المادة الأولية المنتقاة. نتيجة لذلك، يمكن ملاحظة نوعين من التأثيرات في الخلايا المعلقة بحرية في المائع، وكذلك في الكائنات مقيدة الحركة داخل تجمعات خلوية أو حبيبات صلبة.



الشكل 1.8: سلسلة خطوات النقل الكتلي لمادة أولية أو مادة غذائية من فقاعة غازية أو قطرة مائع أو حبيبة صلبة نحو موقع التفاعل داخل الخلية: (1) انتقال (بواسطة الانتشار بشكل رئيسي) المادة الأولية من الطور الغازي، أو المائع أو الصلب إلى السطح البيني ذي الطور المائي المائع. (2) النقل (عادة بواسطة الارتباط بين الانتشار والرفع الحراري) عبر طبقة حدودية ساكنة للطور المائي محيطة بالفقاعة الغازية أو لقطيرة المائع أو للحبيبة الصلبة. (3) النقل (عادة بواسطة الرفع الحراري أو الاضطراب) عبر عموم الطور المائع إلى طبقة حدودية رقيقة محيطة لكائن مجهري مفرد أو حبيبة (تجمع كائنات أو كتلة مترسبة أو ناقل مقيد الحركة) تحتوي على مجموعة من الكائنات. (4) النقل (الانتشاري) عبر هذه الطبقة الحدودية إلى سطح الخلية. (5) النقل (غير مفعل وبواسطة الانتشار و/أو نقل فعّال بواسطة أنزيمات النقل) عبر غلاف الخلية إلى موقع معين داخل الخلية حيث يتم التفاعل: ملاحظة: النواتج المتكونة تأخذ المسار المعكوس.

1. يكون المعدل العمومي للتفاعل أقل من الحد الأقصى النظري، ويكون ناتج العملية أبطأ من المطلوب. تلاحظ هذه الحالة عند إنتاج حمض الجلوكونيك (Gluconic acid) من الجلوكوز بواسطة البكتريا الهوائية *Gluconobacter oxydans*. يحدد المعدل العمومي للتفاعل هنا بواسطة معدل نقل الأكسجين إلى الطور المائع. ولا يحدث بعد رفع عامل التحديد أي تأثير غير رجعي (Irreversible)، في هذا الكائن المجهري بالتخصص. مثال آخر هو تحديد عملية تجهيز السكر إلى الخلايا المقيدة الحركة وذلك بسبب الانتشار البطيء داخل ناقل مقيد الحركة. هنا غالباً ما يختزل معدل الإنتاج العمومي وبشكل رجعي. علماً أن هناك أمثلة لأنظمة أخرى تتضرر فيها قابلية التصنيع الحيوي للخلية بشكل غير رجعي بعد تحديد عملية نقل الأكسجين (مثلاً في تخميرات البنسلين). تكون مثل هذه العمليات حساسة جداً لمحددات النقل الكتلي.
2. تغير انتقاء التفاعل أثناء تصنيع خميرة الخبز من الجلوكوز، يعمل الأكسجين كمستقبل للإلكترونات. وفي غياب الأكسجين تتوجه الالكترونات إلى البايروفيت (Pyruvate) مما ينتج منهُ تكوين الايثانول وثاني أوكسيد الكربون بدلاً من مزيد من الخمائر. تنتج مزرعة بكتريا *Bacillus subtilis* عادة مادة الأستوين (Acetoin) والـــ بيوتانديول (2.3 butanediol) عندما تحرم من الأكسجين. وتعتمد نسبة الناتجين بشكل كبير على تركيب الأكسجين المذاب، وبالتالي على نسبة معدلات نقل الأكسجين واستهلاكه. وقد يكون الضرر في هذه الحالة رجعياً أو غير رجعي.

2.2.8 النقل بين الأطوار Transfer between phases

إن نقل الأكسجين من الفقاعة الهوائية إلى الكائن المجهري أثناء العمليات الحيوية الهوائية هي خطوة انتقال بطيئة نسبياً. وقد ينضب الأكسجين وغيره من الغازات الذائبة التي تنتشر في المحاليل المائية (مثل الهيدروكربونات إلى حد أربع ذرات كربون) بسرعة كبيرة أثناء استهلاكها، وإذا لم تعوض بنفس المعدل العالي فإن الحالة ستكون مضرة بالكائن المجهري. إن عملية نقل المواد عبر حدود مائع إلى مائع

أو مائع إلى صلب، مشابهة لعملية النقل الكتلي بين غاز – سائل. مثال على ذلك هو النمو على الهيدروكربونات العالية ($> C_6$). يوجد الطور الزيتي على شكل قطرات صغيرة، وتكمن المقاومة الرئيسية للنقل الكتلي في طبقة الماء المحيطة بقطرات الزيت. كما أن تبادل المواد بين الطور الصلب (حبيبات المادة الأولية أو حبيبات تحتوي على كائنات مجهرية) والطور المائع تطبيع مبادئ مشابهة.

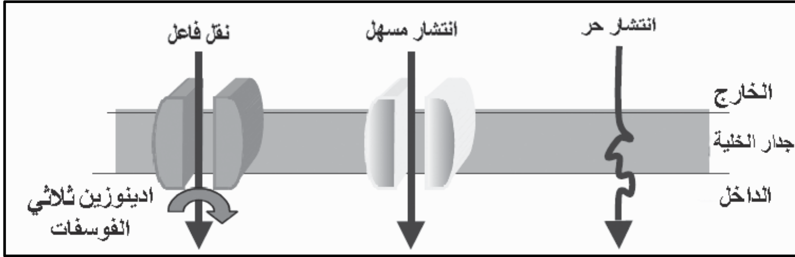
3.2.8 النقل داخل الطور المفرد Transfer inside a single phase

توجد، عادة، داخل فقاعة الغاز أو قطرة الزيت حركة كافية لتضمن نقلاً سريعاً للجزيئات إلى السطح البيني (Interface) مع الطور المائي، ولذا تكون المقاومة على الجانب المائي للسطح البيني. فإذا كانت المسافات، في عموم طور المائع، التي يتوجب اجتيازها كبيرة نسبياً، عندها يمكن حصول مقاومة نقل في هذا الطور. تحدث مثل هذه الحالة في المفاعلات الحيوية الكبيرة، حيث تجري عملية خلط المائع بظروف أقل من المثالية (Optimal) (يمكن تطبيق مفهوم الخلط المثالي في المفاعلات الصغيرة فقط). لذا يكون من الضروري أن نتعلم التعايش مع هذه المحددات الممكنة أثناء عمليات التصنيع الكبيرة. وعليه فإن تأثيرها في التفاعل المايكروي يجب أن يتبادر إلى الذهن أثناء تطوير العملية. إن محددات النقل الكتلي داخل الطور الصلب يمكن أن تكون داخل حبيبات الحفاز الحيوي التي تحتوي على الكائنات المجهرية المقيدة الحركة، إما على شكل غشاء حيوي سطحي مرتبط بالناقل مقيد الحركة، أو تكون متفرقة خلال مادة الناقل. البديل لذلك، هو أن الكائن المجهري نفسه، خاصة إذا كان خيطياً، قد يكون متواجداً على شكل تجمع خلوي أو على شكل كتلة مترسبة. قد تستهلك المادة الأولية بسرعة كبيرة أثناء دخولها إلى الحبيبات، أو الكتلة المترسبة بحيث لا يصل إلى أي شيء منها إلى القص الداخلي للحبيبات، وعليه ستكون كفاءة الحفاز أقل من الحد الأعلى. كما يمكن أن يتباطأ التفاعل بسبب عدم ابتعاد النواتج السمية أو المثبطة بسرعة كافية.

4.2.8 النقل عبر غلاف الخلية Transfer across the cell envelope

يمكن اعتبار الكائنات المجهرية نفسها كطور منفصل (صلب أو مائع). إن النقل عبر غلاف الخلية (غالباً ما يمثل جدار الخلية والغشاء السايتوبلازمي) يمكن أن

يكون محدداً، وذلك اعتماداً على الحجم والخصائص الفيزيائية (الشحنة الكهربية، وكره الماء Hydrophoticity) للجزيئات، وفيما إذا كان الكائن مجهزاً بآلية نقل متخصصة أم لا. يمكن وبصورة عامة، تمييز ثلاث آليات نقل مختلفة (الشكل 2.8).



الشكل 2.8 ثلاث آليات للنقل الكتلي عبر غلاف الخلية.

- الانتشار الحر (Free diffusion): وهو عملية نقل سلبي تتجه من التركيز الأعلى إلى الأدنى.
- الانتشار الميسّر (Facilitated diffusion) وهو مشابه للأعلى. ولكن يسرع بواسطة بروتينات ناقلة.
- النقل الفعال (Active transport): النقل بواسطة بروتين نقل مع دخل لطاقة حرة (Atp).

إن قطر الخلية المجهرية صغير جداً (حوالى 1-5 مايكرومتر) لذا تكون عملية الانتشار داخل الخلية أسرع من النقل عبر الغلاف. إضافة إلى ذلك، ففي خلايا حقيقة النواة توجد عضيات داخل الخلية -Intracellular organelles– (فجوات، مايتوكوندريا) التي يمكن أن تمثل حواجز أخرى للنقل. مع ذلك وبالمقاييس الكمية، فإن هذا النوع من النقل يكون أسرع كثيراً من معدل الاستهلاك داخل الخلية، ولن يحدد عادة المعدل العام في سلسلة خطوات النقل.

3.8 معالادت النقل الكتلي Mass transfer equations

1.3.8 المبادئ الأساسية Fundamental Principles

ينص قانون فيك (Fick's law) على أن النقل الكتلي (J) لمكون ما في طور مفرد، له علاقة تناسبيه مع تدرج التركيز باتجاه النقل. التعبير عن جريان الكتلة الثابت (Steady – state mass flux)، هو :

$$J = -D \, dC/dx \qquad (1.8\text{أ})$$

بالنسبة إلى التحول الكتلي في الطور الصلب، فإن D هي قابلية الانتشار المؤثرة (Effective diffusivity) وهي دالّة لمعامل الانتشار، ولمسامية الصلب، ولشكل القنوات داخل الصلب. إن العلاقة بين جريان الكتلة وفرق التركيز Δc هي:

$$J = D\Delta C/d \qquad (1.8\text{ب})$$

تمثل D/d معامل النقل الكتلي، ويمكن أن يوصف معكوسها d/D على أنه المقاومة ضد النقل. وتمثل Δc القوة الدافعة للنقل. (يعتمد هذا كلياً على هندسة طبقة الرقائق (Sheet) المسطحة الحدودية مع سمك (d) في المائع الساكن، ولكنها يمكن أن تطبق على أنظمة المفاعلات الحيوية). أما بالنسبة إلى الجريان الكتلة غير الثابت (Unsteady state)، فإن التوازن الكتلي على طبقة يبلغ قطرها dx ينتج منه:

$$D\delta^2 C/\delta x^2 = \delta C/\delta t \qquad (2.8)$$

يمكن استخدام هذه المعادلات الأساسية النظرية لحساب النقل الكتلي بواسطة عملية الانتشار. لكن ذلك يتطلب غياب الرفع الحراري، إلا أن هذا نادراً ما يحصل. غالباً ما يلاحظ حصول ارتباط بين الانتشار والنقل الحراري مع نقل الطور، وفي هذه الحالة سيكون لدينا مشكلة إضافية وهي عدم معرفة نمط السرعة لسريان المائع. لهذا يتطلب استخدام موائع تجريبية لحالات التحول الكتلي من الغاز إلى المائع ومن المائع إلى الصلب التي تجري في المفاعلات الحيوية الحقيقية.

بالنسبة إلى النقل الكتلي بين طوري السائل – الغاز، أو طوري المائع – الصلب يمكن اعتماد النظرية المعروفة بنظرية الغشائين (Two – films theory) (إقرأ عن النقل الكتلي في أي كتاب منهجي في موضوع الهندسة الكيميائية). يجب وصف جريان الكتلة وبشكل منفصل في كلا الطورين، في حين أن النقل العمومي يمكن تقديره بواسطة خطوتين في سلاسل عبر الغشاء، وكما موضح بالشكل 3.8. بالنسبة إلى النقل بين الغاز والمائع يوصف الجريان الكتلي بواسطة:

نقل عبر غشاء غازي = $J_g = k_g(p - p_i)$

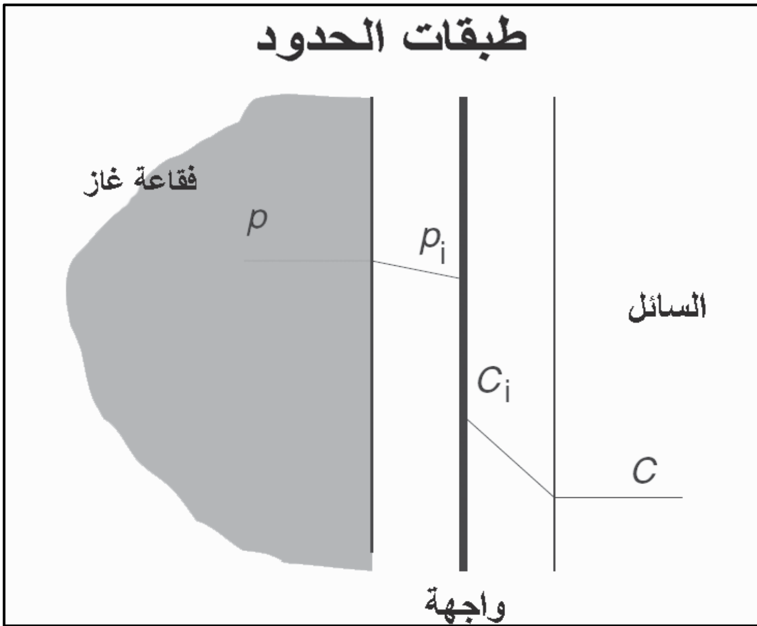
نقل عبر غشاء سائل = $J_l = k_l(C_i - C)$ (4.8)

تكون التراكيز على جانبي الوسط البيني، Pi و Ci، غير متماثلة، ولكنها ترتبط من خلال معامل هنري Henry cfficientt (H):

$$p_i = HC_i \quad (5.8)$$

عملياً لا يمكن قياس قيم السطوح البينية، وعليه فمن الأفضل إزالتها من المعادلات (3.8) و(4.8) و (5.8) وكتابة السريان الكتلي كدالة للتراكيز في عموم الطورين بالآتي:

$$J = K(C^* - C) \quad (6.8)$$



الشكل 3.8 نظرية الغشاءين: النقل الكتلي عبر حدود السطح البيني يتألف من خطوتين متتاليتين. حيث تمثل *C (=p/H) قيمة التشبع في الطور المائع. لاحظ أن المعادلة (6.8) هي بنفس شكل المعادلة (1.8–ب). تمثل (*C-C) القوة الدافعة العمومية، وإن معامل النقل العمومي (K) ينتج من عملية جمع مقاومات النقل.

$$1/K = 1/(Hk_g) + 1/k_1 \quad (7.8)$$

غالباً ما يمكن تبسيط هذه المعادلة إلى $1/k >> 1/(Hk_g)$ (أي أن قيمة مقاومة غشاء الطور الغازي لا تذكر مقارنة بمقاومة غشاء المائع). يعبّر عن قيمة النقل الكتلي عادة بالنسبة إلى وحدة حجم المفاعل الحيوي وليس إلى وحدة مساحة السطح البيني. يعود السبب في ذلك إلى أنه وفي حالات عديدة، منها حالة التعامل مع المفاعلات الحيوية المنشورة بالغاز، أو المخفوقة، أو عند استخدام مفاعلات المهود المحشوة، حيث يكون من الصعوبة بمكان تحديد مساحة السطح البيني المتاح للنقل الكتلي. ولهذا يحسب معدل النقل الكتلي الحجمي من العلاقة:

$$Ja = k_1 a(C^* - C)$$

حيث تمثل a مساحة السطح البيني بين الغاز والمائع لكل وحدة حجم مائع في المفاعل، أو المساحة لكل وحدة حجم غاز + صلب + مائع، أو المساحة لكل وحدة حجم كلي للحوض. أما عند التعامل مع نقل الأكسجين من الغاز إلى المائع، فإن الناتج Ja يسمى عادة معدل نقل الأكسجين (Oxygen transfer rate : OTR).

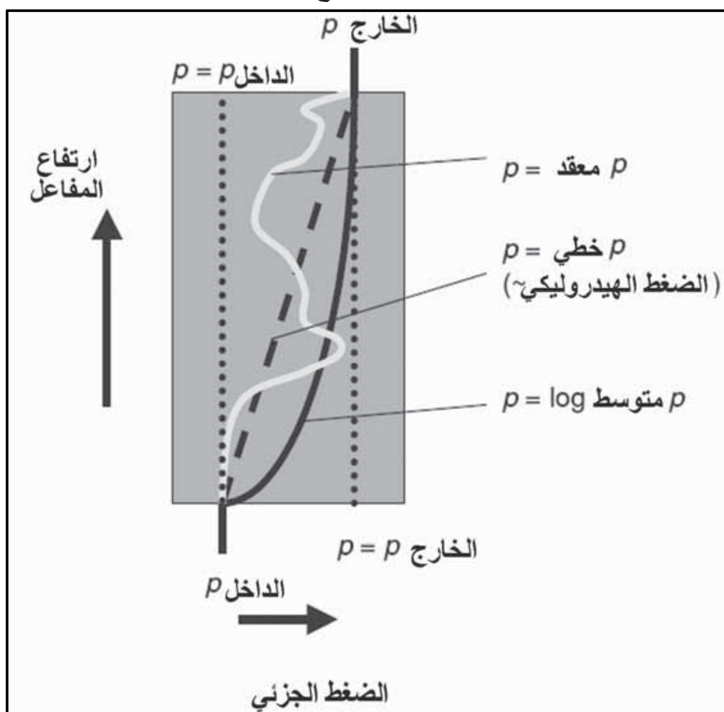
لأجل الحصول على تقدير صحيح لقيمة k_1a، يجب افتراض قيم لكل من C^* (أو P) و C.

بالنسبة إلى المفاعل الحيوي المختبري (حجم أقل من 10 لترات) يفترض أن يكون طور عموم المائع مخلوطاً بصورة جيدة، وعليه تكون قيمة C ثابتة خلال المائع. علماً أن هذه الحالة لا تحدث في معاملات المعامل الريادية أو مفاعلات الإنتاج الضخم (أكبر من 100 لتر)، يجب في هذه الحالة الأخذ بعين الاعتبار الاختلافات بالتراكيز في المواقع المختلفة من الحوض، (انظر كذلك القص 5.8). وعليه يجب أن نفترض أن إحدى الحالات التالية يمكن تطبيقها على الطور الغازي (شكل 4.8):

1. P = Pin = ثابت: يكون هناك عدم نضوب أو نضوب، قليل للغاز الداخل،
   a. والذي يحدث عادة في المفاعلات الصغيرة ذات السريان العالية للغاز والنقل القليل نسبياً.

2. $P = P_{out}$ = ثابت: عندما يكون الطور الغازي مخلوطاً بشكل ممتاز، الذي يحدث أيضاً في الأنظمة الصغيرة، ولكن عندما يكون معدل النقل عالياً مقارنة بجريان طور الغاز.

3. P تتغير داخل المفاعل، في المفاعلات الصغيرة تكون قيمتها معدل قيمة اللوغارتيم[1]، أما في المفاعلات الكبيرة ذات الخلط الجيد فإن الضغط الهيدروستاتيكي هو الذي يحدد قيمة P، وفي حالة الأوعية كبيرة الحجم ذات الخلط السيئ يجب استعمال صيغ أكثر تعقيداً.



الشكل 4.8: ثلاث منحنيات محتملة للضغط الجزئي لمركب في الطور الغازي في حوض تفاعل.

لاحظ أن قيمة H، وبالتالي قيمة *C هي دالة لمكونات المائع ودرجة الحرارة (يكون الغاز عادة أقل ذوباناً في درجات الحرارة الأعلى). كما أن قانون هنري (Henry's law) يشير إلى أن قيمة *C تعتمد خطياً على قيمة P.

[1] متوسط التركيز اللوغاريتمي (Logarithmic mean concentration): $C_{lm} = (C^* - C)l_n \frac{C^*}{C}$.

هناك عدد من النظريات التي يمكن استخدامها لتقدير قيمة k_1 و a بصورة منفصلة، إلا أن جميع هذه النظريات تعاني افتراضات مشكوكاً بها عندما تطبق على السوائل المتحركة في المفاعلات الحيوية الحقيقية، ولكنها تعطي فكرة كمية عن النواحي الأساسية للنقل الكتلي.

تتوفر تفاصيل هذه النظريات في معظم الكتب المنهجية لموضوع الهندسة الكيموحيوية.

2.3.8 النقل الكتلي من الغازات إلى المائع في الأنظمة الحية

Gas-Liquid transfer in real systems

حازت عملية نقل الأكسجين من الطور الغازي إلى الطور المائع في عمليات المفاعلات الحيوية على اهتمام كبير. وبما أن عملية تقدير قيم k_1 و a وبصورة منفصلة تجريبياً هي عملية صعبة للغاية، فإن قيمة k_1a غالباً ما تعامل كقيمة مجتمعة. يمكن للمرء أن يجد في أدبيات هندسة العمليات الحيوية العديد من التعبيرات لهذا (النقل الكتلي الحجمي) المعامل. يجب علينا هنا أن نفصل بين أنواع المفاعلات الحيوية السائدة الاستعمال مثل أعمدة الفقاعات ومفاعلات الرفع الهوائي (Airlift) ومفاعلات الأحواض المخفوقة (انظر الفصل السابع). إن الخصائص الفيزيائية للمائع قد تؤثر في مقدار النقل الكتلي في كل حالة من هذه الحالات. ويمكن إعطاء قيم متطرفة في حالات:

- المائع الذي يحفز على اندماج الفقاعات بدرجة كبيرة، أي مائع الاندماج (Coalescing liquid)، يكون النقل الكتلي ضعيفاً في هذه الحالة.
- المائع الذي يكبت اندماج الفقاعات بشكل كبير، أي مائع اللااندماج (Non coalescing). يعطي هذا النوع من السوائل أعلى قيم لمعدلات النقل الكتلي.

يدخل الغاز في مفاعلات أعمدة الفقاعات (انظر الفصل السابع، جزء 2.2.7) من خلال ثقوب الناشر أو الرشاش. إذا كان الوسط الزرعي المائع من نوع سوائل الاندماج غير اللزجة (أي مثل الماء المقطر أو ماء الحنفية) فإن الفقاعات ستأخذ سريعاً

معدل قطر توازنها الذي يبلغ 6mm، تقريباً. عندما يكون معدل سريان الهواء عالياً بالدرجة الكافية فإن المفاعل سيعمل بنظام السريان المتباين (Heterogeneous flow regime)، ثم يتوقف. إن (ε) دالة لسرعة الغاز السطحية (= سريان الغاز لكل وحدة مساحة المقطع العرضي للمفاعل)، مصححة على أساس فرق الضغط (تشير Po إلى ضغط مرجعي قيمته 1 بار):

$$\varepsilon = 0.6(v_g p_0/p)^{0.7} \qquad (9.8)$$

لأجل حساب معامل النقل الكتلي فإن المعادلة التالية قد اختبرت وأجيزت تجريبياً:

$$k_1 a = 0.32(v_g p_0/p)^{0.7} \qquad (10.8)$$

عند استخدام سوائل اللااندماج مثل المحاليل الأيونية وبعض أنواع أوساط التخمير الزرعية ترفع الفقاعات الناشئة من ناشر أو رشاش الغاز إلى الأعلى، ولكنها لا تندمج مع الفقاعات الأخرى، شرط أن يكون حجم الفقاعات أقل من 6 ملم. وعليه فإن مساحة السطح البيني، وبالتالي قيمة k_1a ستكون في هذه الحالة أعلى مما لو كانت الفقاعات أكبر حجماً، إذ إنها ستنفجر وتأخذ عندها نفس قيمة التوازن لسوائل الاندماج. لوحظ في مفاعلات أعمدة الفقاعات الكبيرة (أكبر من $50\ m^3$)، أن الفقاعات المتكونة تتمدد حجمياً وبشكل ملحوظ كلما ارتفعت خلال حوض المفاعل، وذلك بسبب انخفاض التغايرات في الضغط الهيدروستاتيكي. ستؤثر هذه الحالة في النقل الكتلي.

توجد في مفاعلات الرفع الهوائي (الفصل السابع، جزء 3.2.7) منطقة تسمى منطقة الصاعد (Riser section)، حيث يؤدي تكون الفقاعات فيها إلى سريان المائع إلى الأعلى، ومن ثم تحرر الفقاعات من المائع، ومنطقة تسمى منطقة النازل (Down comer section) حين يعاود المائع بالتحرك نحو الأسفل. وعلى الرغم من مشابهة منطقة الصاعد لعمود الفقاعات، إلا أن الغاز المحجوز يكون أقل مما يمكن توقعه من المعادلة (9.8) وذلك بسبب التفاعل مع سريان المائع، وعليه فإن قيمة k_1a تكون أقل، بمقدار قد يصل إلى حد الثلث، من قيمتها في مفاعلات أعمدة الفقاعات؛ علماً أن الحصول على قياس كمي بشكل دقيق ليس سهلاً.

تم تحديد ظاهرة السريان في مفاعلات الأحواض المخفوقة (Stirred-tank reactors) عن طريق الموازنة بين قوى التهوية وقوى الخفق، وبين عدد كبير من التغايرات الموضعية بالارتباط مع عدد من نظم انتقال السريان، مما يجعل التقدير الكمي الدقيق للنقل الكتلي عملية صعبة. يتجمع عادة الغاز الرطب المبثوث في المائع وبسرعة في الفجوات الغازية المتكونة خلف شفرات الخفاق أثناء دورانها.

تتكون دوامات اضطراب شديدة عند الطرف الخلفي لهذه الفجوات، ينتشر منها الغاز على شكل فقاعات صغيرة تدخل عموم المائع. تتبع هذه الفقاعات سريان المائع، ولكنها ترتفع أيضاً إلى سطح المائع في الحوض. وتندمج الفقاعات في المناطق الهادئة نسبياً ثم يعاد توزيعها في الأمكنة ذات جهد القص العالي. يرجع قسم من هذه الفقاعات إلى التجاويف الغازية في حين تهرب البقية عند السطح. هذا وتتوفر معادلة لمتوسط الغاز المحجوز في السوائل المندمجة:

$$\varepsilon = 0.13(P_s/V_1)^{0.33}(v_g p_0/p)^{0.67} \qquad (11.8)$$

أما بالنسبة إلى السوائل اللاندماج فإن قيمة الغاز المحجور تكون أكثر بكثير. إن العلاقات الخاصة بـــ K_{1a} هي علاقات تجريبية خالصة. يشار عادة إلى سوائل الاندماج واللاندماج المتطرفة بواسطة المعادلات العامة (درجة الدقة ~ 30%) التالية، التي تكون صالحة عندما تكون قيمة Ps/V_1 بين 0.5 و 10 kW/m^3.

(12.8) سوائل الاندماج: $k_1a = 0.026(P_s/V_1)^{0.4}(v_g p_0/p)^{0.5}$

(13.8) سوائل اللاندماج: $k_1a = 0.002(P_s/V_1)^{0.7}(v_g p_0/p)^{0.2}$

في سوائل الاندماج، تكون k_1a أكثر حساسية للتغيرات في التهوية من التغيرات في الخفق، في حين يكون العكس صحيحاً في حالة سوائل اللاندماج. لاحظ أن العلاقات لا تعتمد على نوع الخفاق. إن الطاقة الداخلة بواسطة الخفق هي عامل متغير مهم في المعادلات (11.8) و (12.8) و (13.8). ويعبر عن كمية القدرة المسحوبة بواسطة خفاق ذي قطر D وسرعة دوران N بالمعادلة:

$$P = P_o \rho_l N^3 D^5 \quad (14.8)$$

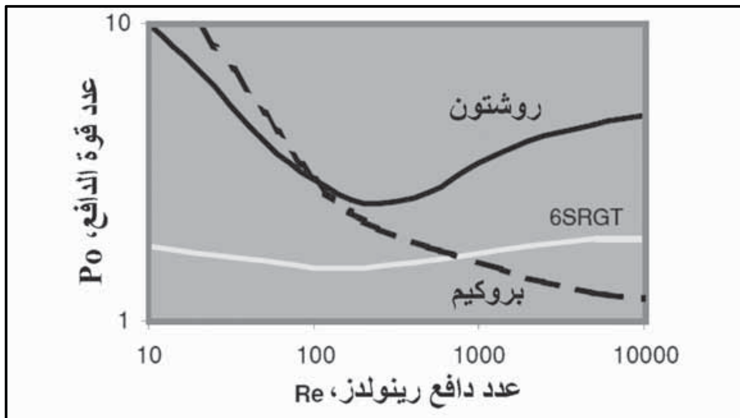
إن رقم قدرة الخفاق (P_o) هو دالة لمعدل التهوية ولرقم رينولدز ($=P_l ND^2/\mu$) ولنوع الخافق (انظر الشكل 5.8). تنخفض قيمة P_o عموماً عندما تتم تهوية الوسط الزرعي المائع وذلك بسبب زيادة حجم الفجوات خلف شفرات الخفاق. وتنخفض قيمة Po بمقدار 2 في حالة خفاق روشتون النموذجي، في حين لا يحدث انخفاض ملحوظ عند استخدام خفاق من نوع سكابا (Scaba type 6SRGT).

مثال

إن أداء نقل الأكسجين في مفاعل الحوض المخفوق هو أفضل، عموماً، من أدائه في مفاعل عمود الفقاعات الذي له نفس المواصفات الهندسية ومعدل التهوية. وعند استخدام مائع اندماج في مفاعل يبلغ حجمه التفاعلي $100\ m^3$، قطر حوضه 3.5، ومعدل التهوية فيه 1vvm (أو $1.67\ N/m^3/s$)، والضغط في المساحة الرأسية (Head – space) 2 بار، وقطر الخافق 1.75 m ودخل القدرة لكل وحدة حجم 2 $p/V_1 = kW/m^3$، فإننا نحصل على:

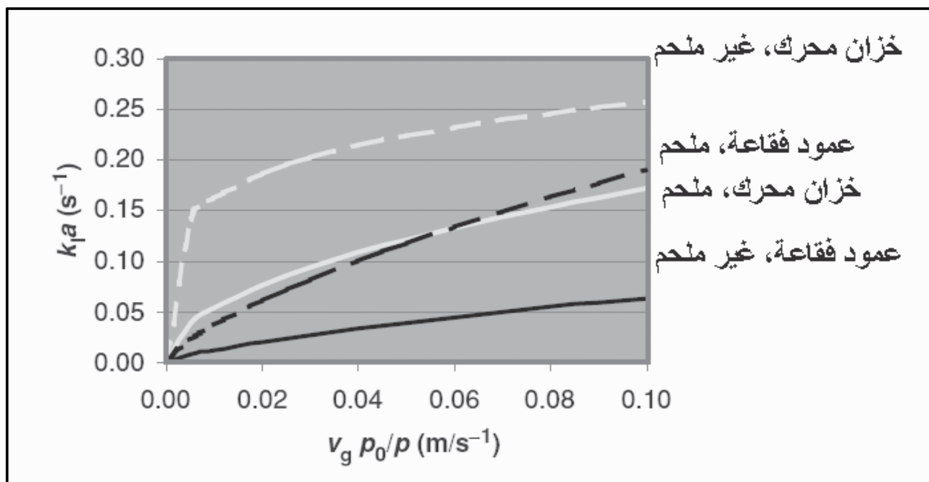
مفاعل عمود الفقاعات: معادلة (8-10): $k_{1a} = 0.05/s$

مفاعل الحوض المخفوق: معادلة (8-12): $k_{1a} = 0.14/s$



الشكل 5.8 بعض أرقام القدرة للخفاق (Po) من ذوات عدم تهوية، كدالة لرقم رينولوز (Re). في نظام السريان المضطرب وبغياب التهوية، تكون قيمة Po لتوربين روشتون ذي الشفرات

الست القياسي، ثابتة عند 5. اما بالنسبة إلى خفاق سكابا 6SRGT فهي 1.7 وفي حالة خفاق بروكيم (Prochem) فهي 1. أما في نظام السريان الرقائقي فهناك تناسب عكسي مع قيمة Re (على سبيل المثال، بالنسبة إلى خفاق روشتون (Po = 64/Re).



الشكل 6.8 توضيح لعملية نقل الأكسجين في المفاعلات والأوساط الزرعية المختلفة، كدالة على سرعة الغاز السطحية باستخدام المعادلات (10.8) و (12.8) و (13.8). يفترض هنا أن قيمة k_{1a} في عمود الفقاعات الذي يحتوي على وسط زرعي لاندماجي، هي ثلاث مرات قيمتها بالأوساط الاندماجية.

بافتراض أن قيمة (C-C*) = (0.10 mol/m^3 – 0.5 mol/m^3) = 0.49 mol/ m^3، فإن قيمة معدل نقل الأكسجين سيكون 0.024 mol/ m^3/s، في حين ستكون 0.070 mol/ m^3/s في الحوض المخفوق. بالرغم من هذا فإن مفاعلات أعمدة الفقاعات تستعمل بشكل متكرر في العمليات الحيوية، وذلك بسبب محاسنها الأخرى مثل سهولة بنائها والتوزيع المتساوي لمعدل القص والحاجة إلى دخل قدرة أقل... إلخ (انظر أيضاً الشكل 6.8).

عند استخدام تركيز عالٍ من الكائنات المجهرية الخيطية، فإن الخيوط المتشابكة للمايسيليوم تتداخل مع بعضها البعض مكونة تجمعات كبيرة تؤدي إلى التقليل من حرية سريان المائع. ينتج من ذلك لزوجة عالية ومظهر بلاستيكي كاذب (Pseudo plastic) أو حتى مظهر مطاطي (Elastic) للوسط الزرعي المائع. هذا

وقد لوحظ حدوث نفس الشيء عندما يكون الكائن المجهري منتجاً لمواد بوليمرية (Polymeric substances). مثل الزانثان (Xanthan). ويعود انخفاض النقل الكتلي جزئياً إلى اندماج الفقاعات مما يؤدي إلى تكوين فقاعات كبيرة الحجم في الوسط الزرعي المائع. كما أن الغاز المحجوز يكون أقل بسبب سرعة ارتفاع الفقاعات. وكنتيجة لذلك ستكون مساحة السطح البيني صغيرة . تحت الظروف المتطرفة يمكن ملاحظة فقاعات ذات أقطار تبلغ 1m في المفاعلات الحيوية الكبيرة.

يمكن التعويض عن هذا أحياناً بواسطة وجود، وبنفس الزمن، عدد كبير من الفقاعات الصغيرة جداً (قطرها أقل من 1mm) التي تتمتع بفترة مكوث طويلة في الوسط المغذي (15 min أو أكثر). هناك أيضاً تأثير اللزوجة على قيمة k_1. ينتج هذا التأثير من انخفاض في سرعة المائع، وليس كنتيجة مباشرة للزوجة نفسها. علاوة على ذلك، ربما يكون هناك حاجة إلى اختزال القدرة الداخلة إلى الأوساط الزرعية ذات التهوية، وذلك لأن حجم الفجوات خلف شفرات الخفاق يكون أكبر مما يؤدي إلى تقليل معدلات القص وانفجار الفقاعات.

لقد وصفت هذه التأثيرات المرتبطة والمعقدة في الأدبيات العلمية من خلال توسيع المعادلات (10.8) و (12.8) و (13.8) باستخدام العامل μ^{-n}، حيث تتراوح قيمة n عادة بين 0.5 إلى 0.9. وعليه ففي الأحواض المخفوقة التي تحتوي على أوساط لاندماجية تكون:

$$k_1a = 0.002(P_s/V_1)^{0.7}(v_g p_0/p)^{0.2}(\mu/\mu_0)^{-0.7} \qquad (15.8)$$

على شرط أن يكون $\mu > \mu_0$ حيث تكون قيمة $\mu_0 = 0.05$ باسكال ثانية (Pas)، إذا تصرف الوسط الزرعي المائع مثل مائع بلاستيكي كاذب (تقل اللزوجة بزيادة معدل القص) أو مثل مائع باسط (Dilatant) (تزداد اللزوجة بزيادة معدل القص)، فإن متوسط اللزوجة للمفاعل:

$$\mu = K\,\dot{\gamma}^{n-1} \qquad (16.8)$$

وعليه يمكن حساب متوسط معدل القص من المعادلة:

$$\dot{\gamma} = 10N \qquad (17.8)$$

تعتمد قيم k و n في نموذج الانسياب (Rheology model) على تركيز الكتلة الحيوية، وتتناسب K عادة مع C_x^a حيث تتراوح قيمة α من 1.5 إلى 4.0. وتكون قيمة n<1، في الأوساط البلاستيكية الكاذبة، وتكون قيمة n>1 في السوائل المتعددة، في حين تكون n = 1 في الأوساط النيوتونية (Newtonian).

مثال:

وسط زرعي بلاستيكي كاذب في مفاعل حيوي له الصفات التالية:

Cx = 30 غم/لتر، K = 1، n=0.4 سرعة الخفاق هي ثلاث دورات/ثانية. باستخدام المعادلتين (8-16) و (8-17) وجدنا أن قيمة اللزوجة هي 0.13 باسكال وحسب المعادلة (8-15) اختزلت قيمة k_{1a} إلى 51% من قيمتها في وسط زرعي قليل اللزوجة. ماذا سيحدث إذا تضاعف تركيز الكتلة الحيوية أو سرعة الخفاق؟ (الجواب: مع تضاعف تركيز الكتلة الحيوية وقيمة α = 2، تختزل قيمة k_1a إلى 19% عند مضاعفة سرعة الخفاق، وستتختزل قيمة k_{1a} إلى 69%.

3.3.8 النقل الكتلي من المائع إلى الصلب

Liquid- solid mass transfer

إن وصف عملية النقل الكتلي خلال غشاء مائع إلى أو من سطح صلب هي أسهل بكثير من عملية النقل الكتلي من الغاز إلى المائع. تعتمد قيمة k_1 في هذه الأنظمة على خصائص المائع/الصلب، ويمكن إيجاد قيمة مساحة السطح البيني بصورة تجريبية. تطبق عملية النقل الكتلي من المائع إلى الصلب عادة في الحالات التي يكون فيها النقل الكتلي والتفاعل متداخلين: تنقل المادة الأولية خلال الغشاء المائع إلى سطح الحبيبة حيث تتواجد الكائنات المجهرية التي ستستهلك المادة الأولية. وتنقل النواتج المتكونة من هذه العملية رجعياً خلال الغشاء إلى عموم المائع. غالباً ما تعامل

هذه الحالات بشروط الحركية الظاهرة (Appearent kinectics)، أي أن معدل التفاعل الملاحظ يوصف بصيغ حركية قياسية، ولكن يضاف عامل تأثير (Effectivness factor) (الذي يتراوح بين 0 إلى 1) لوصف أداء التفاعل مقارنةً بنفس التفاعل، ولكن بعدم وجود محددات للنقل.

4.3.8 النقل الكتلي داخل الحبيبات الصلبة

Mass transfer inside a solid particle

عند وجود كائنات مجهرية نشطة داخل حبيبة أو تجمع خلوي، فإن الانتقال (بواسطة الانتشار) ضمن الحبيبة قد يمثل مقاومة أخرى. وجدت هذه الحالة في عمليات التحفيز الحيوي عند التعامل مع خلايا مقيدة الحركة داخل حبيبات صلبة مسامية أو أملاح الالجينيت (Aliginate). من الصعب وضع وصف مناسب لهذه الظاهرة لأن حركية تفاعلات الكائنات المجهرية داخل الحبيبة قد تختلف كثيراً عن تلك التي تحدث في الخلايا المعلقة بحرية، وبهذا ستكون غير معروفة. يعود هذا إلى تغير الظروف الفسلجية للخلايا. إضافة إلى عامل الفعالية للنقل الكتلي الخارجي، وقد يستعمل عامل الفعالية العمومي، الذي يشمل المقاومة الكتلي الحجمي.

4.8 تحديد معاملات النقل الكتلي الحجمي

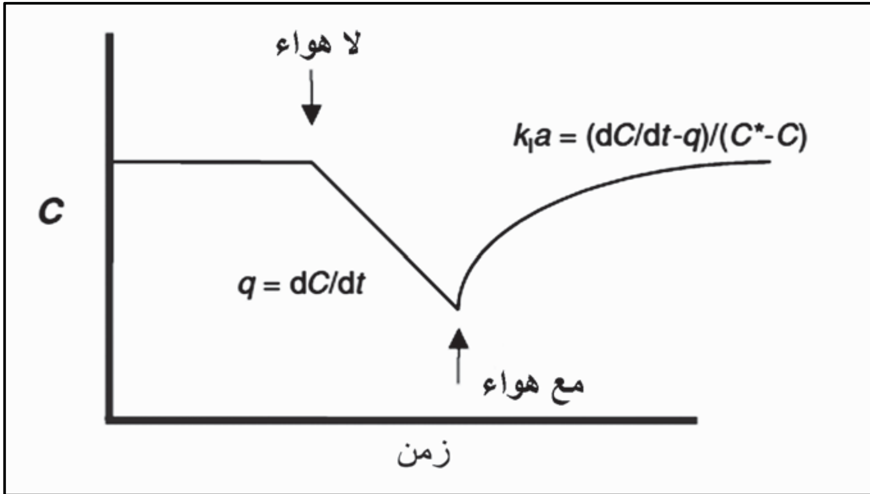
Determination of the volumetric mass transfer coefficient

إذا كان شخص ما مهتماً بالقيم التقريبية لــ k_{1a}، أو عندما يكون إجراء القياسات في أنظمة المفاعلات الحيوية الحقيقية غير عملي أو مكلف من الناحية الاقتصادية، كما هو الحال في المفاعلات الحيوية الكبيرة، فيمكن في هذه الحالة استخدام موائع نموذجية (Model fluids).

تتوفر المعلومات الخاصة بها في الأدبيات العلمية، التي قد تكون نظرية أكثر أو تجريبية أكثر، كما موضح أعلاه، أو يمكن تصميم سلسلة من التجارب الجديدة. إن استخدام الموائع النموذجية، مثل الماء أو المحاليل الملحية مع إضافة عجينة الورق أو إضافة بوليمرات، إذا كان ضرورياً، لتقليد المرق اللزج، تعطي نتائج متطرفة لما يمكن

توقعه في النظم الحقيقية، وتعطي توجهات نوعية (Qualitative trends) كدالة للتغيرات. وهناك القليل من طرق القياس المحتملة:

- ***طريقة التفاعل الكيميائي.*** لأجل تقليد تفاعل جرثومي، يمكن استهلاك أو إنتاج المكونات المنقولة من خلال تفاعل كيميائي. فلغرض دراسة نقل الأكسجين، يمكن استعمال الكبريتيت (Sulphite)، الذي يؤكسد بسرعة إلى كبريتات (Sulphate) بوجود أكسجين ومحفز. ويمكن حساب قيمة k_1a من المعادلة (8.8) عن طريق قياس معدل استهلاك الكبريتيت. Ja (=dcsulphite/dt) و (=p/H for oxygen) C*. وللحصول على نتائج أكثر دقة، يجب انتقاء الظروف بحيث تكون قيمة C مساوية إلى صفر كبدائل للكبريتيت، يمكن استخدام الجلوكوز بالارتباط مع أنزيم الجلوكوز أوكسيداز (Glucose oxidase) (الأكسجين يستهلك هنا)، أو استخدام خليط من H_2O_2 وانزيم الكاتاليز (Catalase) (الأكسجين ينتج هنا). بنفس الطريقة يمكن استخدام محاليل NaOH لدراسة نقل ثاني أوكسيد الكربون (يتفاعل CO_2 بسرعة مع OH^-).
- ***طريقة الإحلال الفيزيائي.*** تصور أن غازاً يتدفق في سائل في حالة مستقرة (Steady state) بحيث تكون قيمة C* مساوية لقيمة C. تبدأ التجربة عندما تتغير وبسرعة قيمة مستوى الأكسجين بطوره الغازي من قيمة معينة إلى أخرى. على سبيل المثال، إحلال الهواء بدل N_2 في مائع يتدفق فيه N_2 عندها تكون قيمة Ja في المعادلة (8.8) مساوية لقيمة dC/dt، ومن خلال القياس المستمر لتركيز الأكسجين في المائع، يمكن تقييم k_1a باستخدام هذه المعادلة. الاحتمال الآخر هو التغيير المفاجئ في ضغط أحد المكونات المراد نقلها. إن هذه الطريقة سريعة جداً عادة، وبالتالي يكون استخدام قطب أكسجين سريع الاستجابة أمراً مطلوباً في هذه الحالة.



الشكل 7.8 تعقب مستوى تركيز الأكسجين خلال تجربة k_1a الديناميكية. يمكن إيجاد قيمة معدل استهلاك الأكسجين (q) من القص الخطي النازل للمنحنى. عندها يمكن إيجاد قيمة k_1a من المنحنى الصاعد، باستخدام الرسم اللوغاريتمي لــ $(C\text{-}C^*)$ مقابل الزمن، على سبيل المثال.

إذا كان المطلوب هو الحصول على قيم حقيقية لــ k_1a فيجب عدم استعمال النظريات والنظم النموذجية أو المعادلات المنشورة في الكتب والمجلات العلمية. يمكن تحديد قيم k_1a تجريباً في المزارع النامية بشكل نشط باستخدام الطرق التالية:

- **طريقة التفاعل الحيوي المستقر** (Steady – state reaction method). عند استعمال نظام مزرعة ميكروبية مستهلكة، في حالة مستقرة (كاذبة)، يمكن حساب قيمة K_1a من المعادلة (8.8)، إذا كانت قيم Ja و C^* و C معروفة، وإذا كان الفرق بين C^* و C كبير بدرجة كافية. فعلى سبيل المثال، بالنسبة إلى الأكسجين ستكون قيمة Ja (OTR) مساوية للفرق في الأجزاء المولية للأكسجين (Oxygen mole fractions) عند مدخل ومخرج الطور الغازي مضروباً بمعدلات سريان الغاز الداخل والخارج (معدل نقل الأكسجين = معدل أخذ (Uptake)

الأكسجين، أو $OUR = OTR$)، تحسب قيمة C^* من ضغط الأكسجين القصئي ($P/H = C^*$)، ويمكن قراءة قيمة C من قطب الأكسجين الذائب.

- **طريقة التفاعل الحيوي الديناميكي** (Dynamic bioreaction method). عندما يختزل سريان الهواء أو يغلق مؤقتاً أو يستبدل بـــ N_2 في مزرعة هوائية، تصبح قيمة k_1a للأكسجين تساوي صفراً. وينخفض تركيز الأكسجين الذائب بسرعة. وسيكون معدل النضوب، dC/dt، مساوياً لمعدل الاستهلاك (q). بعد إعادة سريان الهواء مرة أخرى سيعود التركيز إلى قيمته الأصلية. يمكن أيضاً استخدام المعادلة (8.8) لحساب قيمة k_1a، حيث ستكون قيمة Ja مساوية لقيمة $dC/dt+q$ (لاحظ كذلك الشكل 7.8). يمكن استخدام هذه الطريقة في الأحواض الصغيرة فقط (أقل من 100لتر)، وذلك لأن مكونات الطور الغازي لن تكون متجانسة في الأحواض كبيرة الحجم بعد نشر غاز N_2 (أو أ الغاز المحجوز يجب أن يعاد تكوينه مرة أخرى بعد غلق سريان الهواء). في كل الأحوال، إن وجود قطب أكسجين سريع هو أمر أساسي للحصول على نتائج صحيحة.

5.8 تأثير درجة التضخيم في النقل الكتلي

Effect of scale on mass transfer

1.5.8 التضخيم Scale up

يكون نقل الأكسجين في المفاعلات الحيوية الكبيرة أحسن عادة مما هو عليه في المفاعلات الأصغر حجماً، التي تستخدم في المختبرات أو المصانع الريادية. يعود السبب في ذلك إلى أن إسهام الطور الغازي يكون أكبر (سرعة غاز سطحية أعلى)، وإلى قوة دافعة أكبر (ضغط عالٍ للمساحة الرأسية وللرأس الهيدروستاتيكي).

مثال

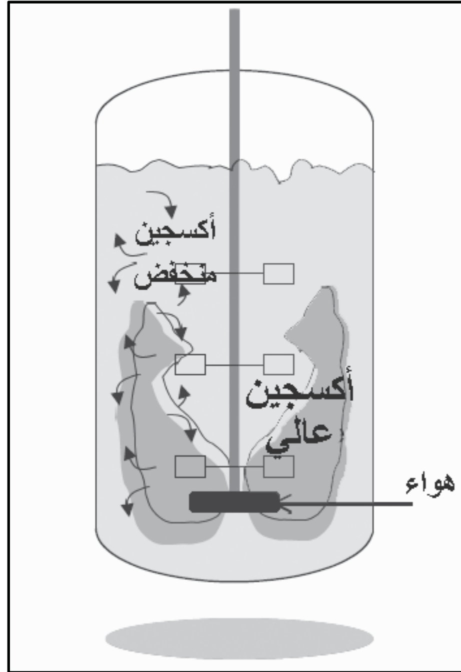
تصور وجود مفاعلين مثاليين من نوع الحوض المخفوق متشابهين هندسياً، أحدهما بحجم تفاعل مقداره $0.1\ m^3$ فيما يبلغ حجم تفاعل الثاني $100m^3$. نسبة Hv/Tv تساوي 3.0 ونسبة D/Tv تساوي 0.5. تتم عملية التضخيم (Scaling up) مع المحافظة على دخل القدرة إلى المفاعل ثابتاً عند $P/V_1 = 2\ kw/m^3$، ومعدل سريان الهواء عند 1vvm ومتوسط ضغط ثابت في المرق (يحدد بواسطة ضغط المساحة الرأسية زائداً الرأس الهيدروستاتيكي) قدره 2.45 بار. بافتراض عدم وجود نضوب في الطور الغازي، أجريت المقارنة التالية (المرق الاندماجي، 0.24 C* = mol/m3عند 1 بار، $C = 0.10\ mol/m^3$):

$$0.1\ m^3\!: v_s p_0/p = 0.007\ m\ s^{-1}, \quad k_1a = 0.046\ s^{-1},$$
$$OTR = 0.022\ mol\ m^{-3}\ s^{-1}$$
$$100\ m^3\!: v_s p_0/p = 0.071\ m\ s^{-1}, \quad k_1a = 0.145\ s^{-1},$$
$$OTR = 0.071\ mol\ m^{-3}\ s^{-1}$$

ماذا سيكون اختلاف معدل نقل الأكسجين (OTR) للمرق اللااندماجي؟ (الجواب: معدل نقل الأكسجين = 0.07 أو 0.12 $mol/m^3/s$ على التوالي). يكون لمعدل نقل الأكسجين حدود عليا في المفاعلات الحيوية الكبيرة الحجم، وذلك بسبب الظروف المقيدة التالية:

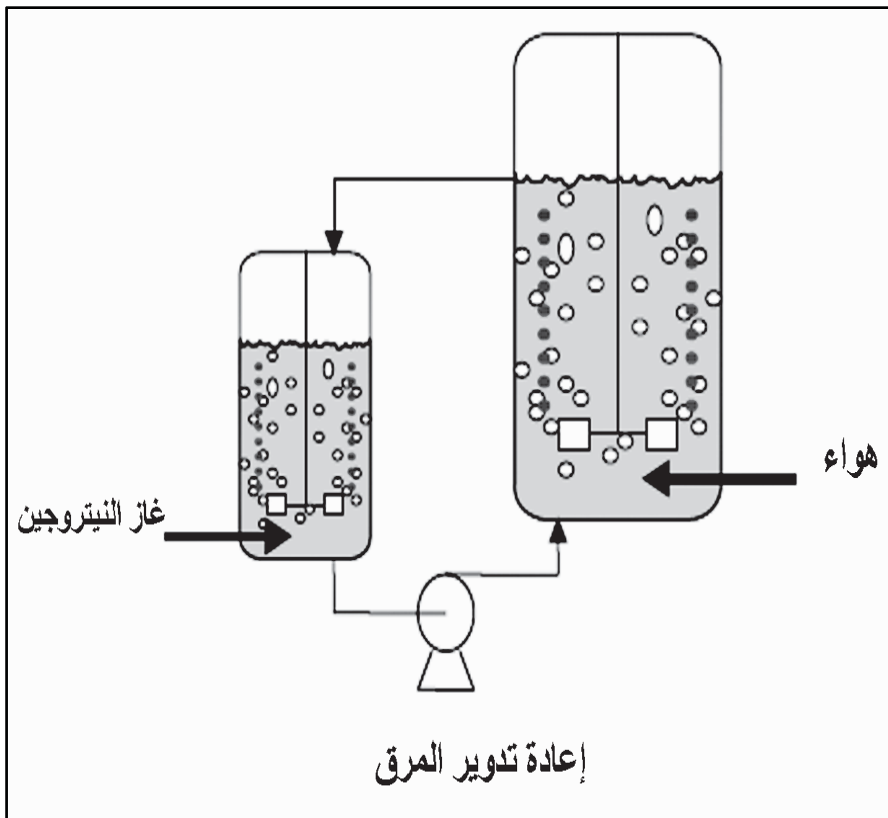
- قد تكون هناك صعوبات ميكانيكية في بناء المخمرات ذات الأحجام الكبيرة جداً (أكبر من $300\ m^3$). علاوة على ذلك فإن عمليات انتقال المائع والخلط تصبح بطيئة جداً مقارنة بالنقل الكتلي والتفاعل، وبهذا تهيمن على معدل التفاعل العمومي. كما أن محددات عملية التبريد قد تصبح أكثر أهمية.
- يجب أن لا يزيد متوسط دخل القدرة على $5\ kw/\ m^3$. إذا زاد على ذلك فقد تتضرر الكائنات المجهرية ميكانيكياً (Mechanically damaged)، كما أن تكاليف الطاقة والاستثمار للمحرك ستكون عالية جيداً.

- يجب أن تكون قيمة سرعة الهواء السطحية المعدلة بالضغط أقل من 0.10 m/s. فإن تكاليف الضاغطات (Compressors) هي من المحددات، وقيمة الغاز المحجوز العالية تزداد على حساب المجال الذي يشغله المرق.
- ضغط المساحة الرأسية له حد أعلى لأسباب ميكانيكية. بالإضافة إلى ذلك فإن الضغط الجرئي لثاني أوكسيد الكربون سيزداد أيضاً مما يؤدي إلى تثبيط النمو والإنتاج.
- لا يمكن اعتبار الطور الغازي مخلوطاً بشكل مثالي. ينخفض الضغط القصئي للأكسجين كلما ارتفعت الفقاعات في حوض المفاعل مما يؤدي إلى اختزال القوة الدافعة للنقل الكتلي.



الشكل 8.8 سريان المائع ونقل الأكسجين في المفاعلات الحيوية الكبيرة. يتم نقل معظم الأكسجين في المنطقة القريبة من الخفاق، أما في أنشوطة الدوران، أي المسار الذي يأخذه الوسط الزرعي من الخفاق خارجاً نحو جسم المفاعل ورجوعاً إلى الخفاق، فإن الأكسجين في هذه الحالة سيستهلك أكثر مما ينقل، وسينخفض تركيزه. يمكن أن يصل طول أنشوطة دوران المائع في مفاعلات الحوض المخفوق الضخمة إلى 10m. فإذا كانت سرعة المائع مساوية إلى 1m/s فسيكون متوسط زمن الدوران 10s.

وعلى أسوأ تقدير (عندما لا يوجد نقل إطلاقاً خارج منطقة الخفق)، ستستغرق 10 s قبل نضوب الأكسجين في الأنشوطة. وعليه، فإن تركيز الأكسجين في المقصورة السفلى للحوض يجب أن يكون عالياً بدرجة كافية بحيث يمكن تجنب حدوث نضوب موضعي يمكن أن يكون ضاراً لحالة الكائن ولمعدل تكوين الناتج. لاحظ أن المعادلة (8.8) تشير إلى أن هذا سيخفض معدل النقل الكتلي لأن القوة الدافعة (C- C*) في القص السفلي منخفضة، ولأن قيم C* و C ستكون عالية.



الشكل 9.8 مثال على مفاعل صغير مكون من مقصورتين صمم لإجراء عمليات تصغير للظروف المستخدمة في المفاعلات الحيوية الكبيرة. كبديل لذلك يمكن استخدام المفاعل الذي ينشر فيه النتروجين، بنمط سريان السدادة plug flow mode (مع بعض التشتيت dispersion).

تصبح عمليات انتقال السوائل والنقل الكتلي أبطأ نسبياً في المفاعلات التي يبلغ حجمها أكثر من $10\ m^3$. إن النقل الكتلي ودوران المائع يتداخلان، ولهذا يجب أن

يعاملا معاً. تحدث معظم عملية نقل الأكسجين، في مفاعلات الحوض المخفوق المزود بخفاقة مفردة، في منطقة الخفق. وتظهر المقارنة بين عملية نقل الأكسجين في أعمدة الفقاعات والأحواض المخفوقة أن قيمة معدل نقل الأكسجين خارج منطقة الخفق قد تشكل ثلث قيمة النقل حول الخفاق فقط.

أهمية أنشوطات الدوران (Circulation loops) موضحة في الشكل 8.8.

2.5.8 التصغير Scale – down

كما أشير سابقاً، يمكن أن تعاني الكائنات المجهرية تغيرات مستمرة عندما تنتقل من مكان إلى آخر داخل حوض مفاعل حيوي كبير. وقد يسبب هذا تأثيرات غير مرغوبة أثناء عملية التضخيم. لتجنب هذه المشاكل يجب أن تؤخذ حالة التضخيم كنقطة مرجعية ومن ثم تدرس التأثيرات المحتملة عن طريق تحفيز حدوث التغايرات، التي تحدث في عملية التضخيم في نظام مختبري صغير الحجم. عندها يمكن تصغير محددات التضخيم، مثل النقل الكتلي ودراستها ولتقليل تأثيراتها بطريقة عملية واقتصادية بالحقيقة، إن عملية التصغير لا يمكن أن تكون دقيقة، وذلك لأن تحديد ظروف التضخيم صعب، كما أنها معقدة جداً مما يصعب فهمها بالكامل.

توجد عدة طرق لإيجاد الحلول المناسبة للتصغير.

- يمكن استخدام مفاعل مكون من مقصورتين، مقلدين في ذلك المنطقتين الأكثر أهمية في المفاعل، وعملية دوران الوسط المائع بينهما، لاحظ شكل 9.8. إن حجم المقصورتين ومعدل الدوران مهم جداً، وكذلك نوع السريان في كل مقصورة، أي يتراوح من المخلوط بصورة جيدة إلى سريان السدادة (Plug flow).

- تطوير وإثبات صلاحية (في عمليات التضخيم) صيغ رياضية بسيطة أو متطورة لسريان المائع يمكن استخدامها في الأحواض الكبيرة، واستخدام المعلومات الناتجة في تصميم تجارب التصغير.
- يمكن استخدام أنظمة اختبار جرثومية موصوفة حساسيتها بشكل جيد لتغايرات مختارة تكون معروفة.
- درست هذه الموائع في الأدبيات العلمية بصورة معمقة لأجل تحسين عمليات نقل الأكسجين وخلط المادة الأولية (الغذاء) في المفاعلات الحيوية الكبيرة.

Further reading — قراءات إضافية

Bailey, J. E. and D. F. Ollis. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1986. Classic textbook on fundamental aspects of bioprocessing.

Kossen, N. W. F. "Scale-up." in: E. Galindo and O. T. Ramirez, eds., *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordecht: Kluwer Academic, 1994. Illustrations of scale-up in industrial practice, giving a feeling for the fitness of use of the available tools, e.g. scale-down.

Merchuk, J. C., S. Ben-Zvi, and K. Niranjan. "Why Use Bubble Column Bioreactors?." *Trends in Biotechnology*: vol. 12 (1994), pp. 501-511. Review on the hydrodynamic, heat transfer and mass transfer characteristics of bubble column bioreactors.

Nielsen, J. and J. Villadsen. *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Plenum Press, 1994. A complete and up-to-date textbook. Stoichiometry, kinetics and bioreactor performance aspects (including mass transfer) are separately treated and then integrated. Uses fundamental aspects of microbial physiology with strong emphasis on mathematical tools.

Nienow, A. W. “Agitators for Mycelial Fermentations.” *Trends in Biotechnology:* vol. 8 (1990), pp. 224-233. Overview on fundamental aspects, use and improvement of different types of agitators, especially for highly viscous mycelia fermentations. Interactions between cell morphology, rheology, mixing, mass and heat transfer processes.

Van‘t Riet, K. and J. Tramper. *Basic Bioreactor Design*. New York: Marcel Dekker, 1991. Application-oriented book on bioreactor design with lots of useful data, guidelines and rules for practical process engineering.

الفصل التاسع

معالجات أسفل المجرى (العمليات الإجرائية)

Downstream Processing

مارسيل أوتينس — **Marcel Ottens**

جامعة دلفت التكنولوجية – هولندا — **Dleft university of Technology The Netherlands**

جوهانس وسلنغ — **Johannes A. Wesseling**

جامعة غرونجن – هولندا — **University of Groningen, The Netherlands**

لووك فان دير ويلين — **Luuk A.M Vander wielen**

جامعة دلفت التكنولوجية – هولندا — **Delft University of Technology**

The Netherlands

التسمية — Nomenclature

a	التعجيل (ms^{-2})
A	مساحة المقطع العرضي (m^2)
B	العرض (m)
c	تركيز المواد الصلبة (kgm^{-3})
C	تركيز الطور المائع (kgm^{-3})
C_D	معامل الكبح (-)
Cp	حرارة خاصة ($Jkg^{-1}\ k^{-1}$)
D	معامل الانتشار ($m^2\ s^{-1}$)

d_p	قطر الحبيبة (m)
d_s	قطر الخفاق (m)
g	التعجيل الأرضي ($9.81\ m/s^2$)
H	الارتفاع (m)
I	القوة الأيونية ($mol\ m^{-3}$)
J	الدفق ($m\ s^{-1}$)
k	معامل النقل الكتلي (ms^{-1})
K	ثابت بالمعادلة (1.9) (-)
L	معدل سريان المغذي (m^3s^{-1})
l	الطول (m)
L	الطول (m)
M	كتلة (kg)
N	سرعة الدوران (s^{-1})
N	عدد الإمرارات في المعادلة (9.1) (-)
P	رقم القدرة (-)
P	الضغط (Pa)
Q	التركيز في الطور المساعد (kgm^{-3})
Q	معدل السريان ($m^3\ s^{-1}$)
q	الدفق الحراري (Wm^{-2})
Q	تركيب صلب أو طور مائع ثانٍ
R	نصف القطر (m)
r	نصف القطر (m)
T	درجة الحرارة (K)
t	الزمن (s)
U	معامل النقل الحراري (ms^{-1})
V	معدل السريان المساعد أو المذيب ($m^3\ s^{-1}$)

v	السرعة (ms^{-1})
V_f	حجم الراشح (m^3)
V_p	حجم الحبيبة (m^3)
x	أحداثي ديكارتيه (m)
x	جزء مولي (-)
Z	الطول (m)
ΔP	فرق الضغط (Pa)
ΔT	فرق درجة الحرارة (K)
α	مقاومة كعكة المرشح الخاصة (mkg^{-1})
ε	حجز المائع (-)
δ	سماكة الغشاء (m)
$\o$	حجز المائع (-)
$\O_v$	معدل السريان ($m^3\ s^{-1}$)
η	اللزوجة الديناميكية (P_{as})
Σ	مساحة الاستقرار المكافئة (m^2)
ρ	الكثافة (kgm^{-3})
w	السرعة الزاوية (rad/s)

الحروف التحتية (Subscripts)

s	صلب
l	مائع

1.9 المقدمة Introduction

قد يفترض البعض أن العمل قد انتهى بعد تكوين المنتوج في المخمر (Fermenter). والحقيقة هي خلاف ذلك، لقد بدأنا تواً. إن البيئة المائعة التي تحتاجها الكائنات المجهرية هي التي تتحكم في إنتاج الجزيئات الحيوية. قد يكون المنتوج هو الكائنات المجهرية نفسها أو مواد أيضية مفرزة إلى المحلول أو محتواة

داخل أجسام ضمنية (Inclusion bodies)، ولكن المخمّر قد يحتوي على نسبة تصل إلى 95% ماء، وبهذا ستكون هناك حاجة إلى جهود كبيرة تبذل لتركيز المنتوج. وهناك علاقة بين تركيز المنتوج في المرق المغذي (Broth) وسعره في الأسواق. فكلما كان المنتوج مخففاً زاد سعر الكلفة. إن إزالة الماء هي أحدى المهام فقط، لأن هناك العديد من المشاكل الأخرى مما يسمى بمعالجات أسفل المجرى (Downstream processing) والتي يقصد بها العمليات الإجرائية اللازمة للإنتاج (DSP). وقد يكون المنتوج داخل الخلايا مما يستدعي خلخلة (Disruption) هذه الخلايا. كما قد يكون مائع المخمر معقداً، ويحتوي على مركبات مشابهة للمنتوج، مما يصعب عملية تنقية المنتوج. وقد يكون هناك حاجة إلى الحصول على المنتوج بنسبة نقاوه عالية: ففي المنتجات الصيدلانية قد تصل درجة النقاوة إلى حد 99.999%. وإن هذه المشاكل هي التي تحدد الطريقة المستخدمة في فصل المنتوجات، التي عادة تحتاج إلى الخطوات التالية:

- خلخلة الخلايا -Cell discruption – (فقط عندما يكون المنتوج داخل الخلايا).
- التصفية (Clarification) (فصل الخلايا وبقاياها عن السائل).
- تركيز المنتوج.
- التنقية (Purification) (تتم غالباً في عدة خطوات).
- صياغة المنتوج -Product formulation– (إعطاء المنتوج صيغة أو شكل مناسب).

تشكل هذه الخطوات أساس هذا الفصل. كل من هذه الخطوات يحتاج إلى واحد أو أكثر من الأجهزة. ما تحتاج معرفته عن هذه الأجهزة هو الحجم وطريقة التشغيل واستعمال العوامل المساعدة مثل المذيبات ومواد الادمصاص (Adsobtents) والطاقة. قد تتكون العملية من عدة خطوات، وكل خطوة لها ناتج من المنتوج النهائي. على الرغم من أن محصولاً بنسبة 95% قد يبدو عالياً لخطوة

مفردة، إلا أن ربط عدة خطوات قد يؤدي إلى تناقص سريع في محصول العملية (0.95^n، حيث تمثل n عدد الخطوات المؤدية إلى 0.95، 0.90، 0.86) تستخدم العمليات الحيوية كميات كبيرة من الأملاح والمذيبات وهي تنتج كميات هائلة من مياه الصرف الصحي الملوث. لأجل توقع تجزئة وقابلية ذوبان الجزيئات الحيوية نحتاج إلى مفاهيم الديناميك الحراري أو الثرموديناميك (Thermodynamics). إن هذا المجال العلمي غير متطور بالنسبة إلى الجزيئات الحيوية (على عكس النفط، على سبيل المثال) وذلك بسبب تعقيد الجزيئات الحيوية وبسبب وجود العديد من المركبات في موائع المخمر. يدعونا هذا إلى إجراء المزيد من التجارب على هذه العملية، إذ لا يمكن للتصميم أن يعتمد على النظريات فقط.

سنتطرق في هذا الفصل إلى نماذج عديدة لوصف الأجهزة إلى جانب طرق تجربية لعمليات التضخيم (Scale-up process) من مستوى المختبر إلى المصنع.

2.9 خلخلة الخلايا Cell discruption

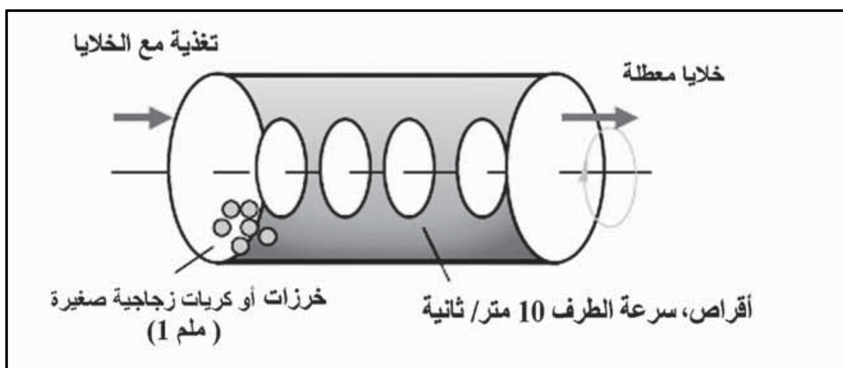
إن الطريقة المثلى في الانتاج تتجسد في تحرير المنتوج المرغوب به من الخلايا إلى مائع التخمير مباشرة مما يسمح بالحصول عليه بطريقة سهلة ومباشرة. إذا كان الكائن المجهري لا يفرز المنتوج إلى الخارج، عندها يمكن استخدام الهندسة الوراثية لتحوير الخلايا بشكل يسمح لها بإفراز المنتوج. ولكن هذا ليس دائماً أمراً سهلاً، ويمكن أن يكون المنتوج المتوقع غير مستقر. وعليه فإن بعض المنتوجات يجب أن تتحرر عن طريق خلخلة الخلايا. يمكن استخدام عدة طرق لخلخلة جدران الخلايا. ويمكن تقسيم هذه الطرق إلى صنفين رئيسيين: الطرق الآلية والطرق غير الآلية. تقتصر الطرق غير الآلية (Non-mechanical) على مستوى التخميرات صغيرة الحجم، وتتضمن:

- التجفيف (Drying) (التجفيف بالتجميد أو ما يسمى بالتجفيد (Freeze drying) التجفيف بالفراغ (Vacuum drying).
- الصدمة الأوزموزية (Osmotic shock)– (تغيير في القوة الأيونية للمحلول يؤدي إلى انتفاخ ثم انفجار الخلية).

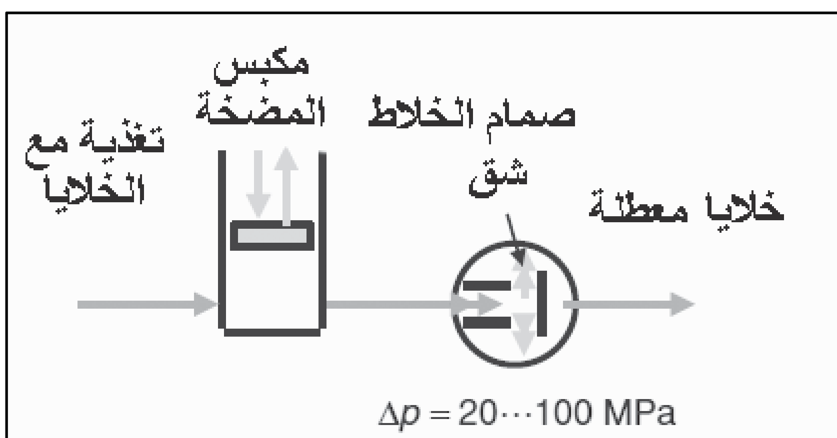
- الصدمة الحرارية (Temperature shock).
- التحليل الكيميائي (Chemolysis) (إضافة مواد كيميائية فعالة الشد السطحي، أو مذيبات، أو مضادات حيوية، أو أنزيمات لتحليل جدران الخلية).

أما بالنسبة إلى التخميرات كبيرة الحجم فتستخدم الطرق الآلية، ومنها:

- المخلخلات فوق الصوتية (Ultrasonic disrupters).
- طواحين الكرّيات (Bead mills).
- المجانسات (Homogenisers).



الشكل 1.9: طاحونة الكريات لخلخلة الخلايا.



الشكل 2.9: مجانس لخلخلة الخلايا.

تستخدم المخلخلات فوق الصوتية بشكل شائع في المختبر، إلا أنها غالية جداً عند استعمالها على مستوى المصنع. تتكون طواحين الكريات من أوعية أسطوانية تحتوي على أقراص دوّارة (بسرعة طرفية حوالى 10 m/s، وكريات (خرزات) يبلغ قطرها حوالى 1mm. تتم خلخلة الخلايا الموجودة في مائع العملية بواسطة قوى القص الحاصلة بين الكريات (انظر الشكل 1.9). يرافق هذه العملية إنتاج حرارة، لذا يتطلب الأمر عملية تبريد. وهذا يضع حدوداً لحجم الجهاز. غالباً ما تستخدم المجانسات على مستوى الإنتاج التجاري (انظر الشكل 2.9). وهذا الجهاز عبارة عن صمام يمكنه تحمّل ضغط يبلغ 40 إلى 100 (MPa). يدفع المائع بقوة خلال شق الصمام وبسرعة عالية لأجل خلخلة وتكسير جدران الخلايا. تسبب التجويفات خلف الشق مزيداً من الخلخلة والتمزق. المجانس جهاز بسيط، ولكن له بعض المساوئ، منها:

أنه جهاز صاخب، قادر على التعامل مع الأحجام الكبيرة فقط، ويتصف بمعدل اندثار عالٍ (Highwear rate)، ويحتاج إلى مضخات قدرة عالية لكي يعمل. تعتمد فعالية المجانس على الكائن المجهري. إذ يمكن خلخلة خلايا البكتريا بسهولة، ولكن ليس خلايا الخمائر. تتم عملية المجانسة من خلال تكرار إمرار النموذج لعدة مرات. يمكن حساب تركيز المنتوج المتحرر بالمعادلة التالية:

$$C = C_{\max}[1 - \exp(-K\,N\,\Delta P^{3})] \qquad (1.9)$$

حيث تمثل Cmax تركيز المنتوج عند تحرره بالكامل من الخلايا، K يمثل ثابتاً يعتمد على درجة الحرارة ونوع الكائن المجهري، N يمثل عدد مرات الإمرار خلال الصمام، P هو مقدار انخفاض الضغط عبر الصمام. يرافق انخفاض الضغط زيادة بدرجة الحرارة ΔT التي يمكن حسابها بتطبيق المعادلة:

$$\Delta T = \frac{\Delta P}{\rho c_{p}} \qquad (2.9)$$

حيث تمثل P كثافة المائع و C_p الحرارة النوعية (Specific heat). إن استرجاع البروتينات غير الثابتة بالحرارة قد يتطلب تبريد المغذي والمنتوج لتفادي حدوث

عملية المسخ البروتيني (Denaturation). إن ارتفاع درجة الحرارة مستقل عن الإنتاج، ولا يؤثر فيه.

3.9 التصفية Clarification

قبل تركيز وتنقية المنتوج، يجب إزالة مخلفات وحطام الخلايا. ينتج من عملية التصفية مائع رائق يحتوي على المنتوج المذاب. تتوفر تقنيتان رئيسيتان للتصفية وهما النبذ المركزي، والترشيح. كما يمكن إزالة الحبيبات الكبيرة من المائع بواسطة الترسيب، إلا أن هذه التقنية لا تستعمل في التقنية الحيوية إلا في حالة وجود تكتلات خلوية كبيرة (Aglomerates).

الإطار 1.9 فرض (Assignment)

أظهر الفحص المختبري أنه في نوع معين من المجانسات يتحرر 40% من البروتين بعد إمرار واحد تحت ضغط 40 Mpa. حدد عدد الإمرارات المطلوبة لتحرير 95% تحت انخفاض ضغطي مقداره 40، 60، 80 و100 Mps.

1.3.9 النبذ المركزي Centrifugation

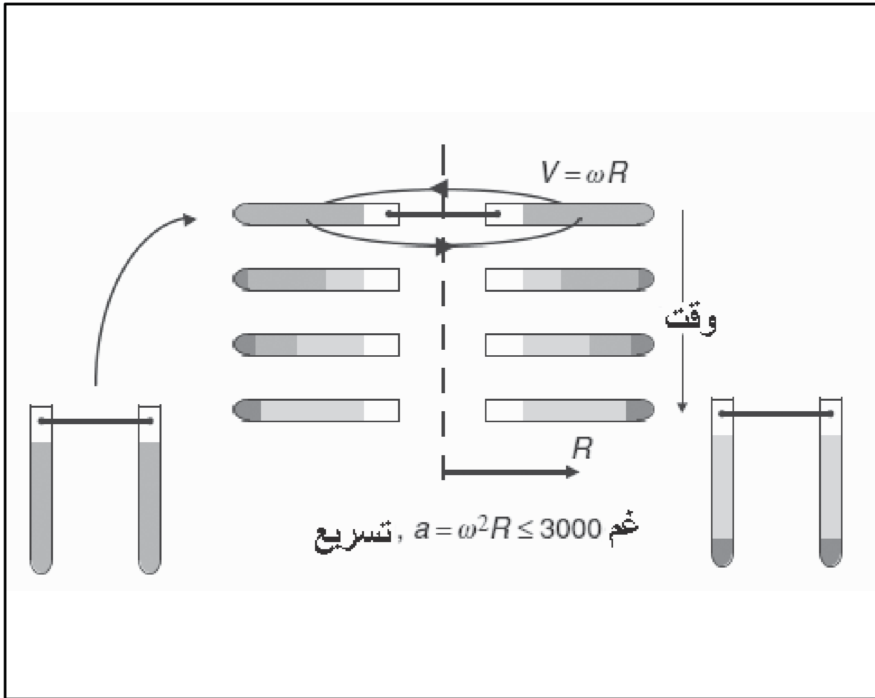
إذا لم تكن الجاذبية بالقوة الكافية لفصل الحبيبات بزمن معقول، فيمكن استعمال جهاز النبذ المركزي. يوضح الشكل 3.9 جهاز النبذ المركزي المختبري. يوضع المعلق المائع في أنبوبتين متماثلتين ويتم تدويرهما. إن قوة التعجيل (a) التي تعانيها الحبيبات تعتمد على المسافة من محور الدوران (R) ومربع السرعة الزواية (w^2):

$$a = \omega^2 R \qquad (3.9)$$

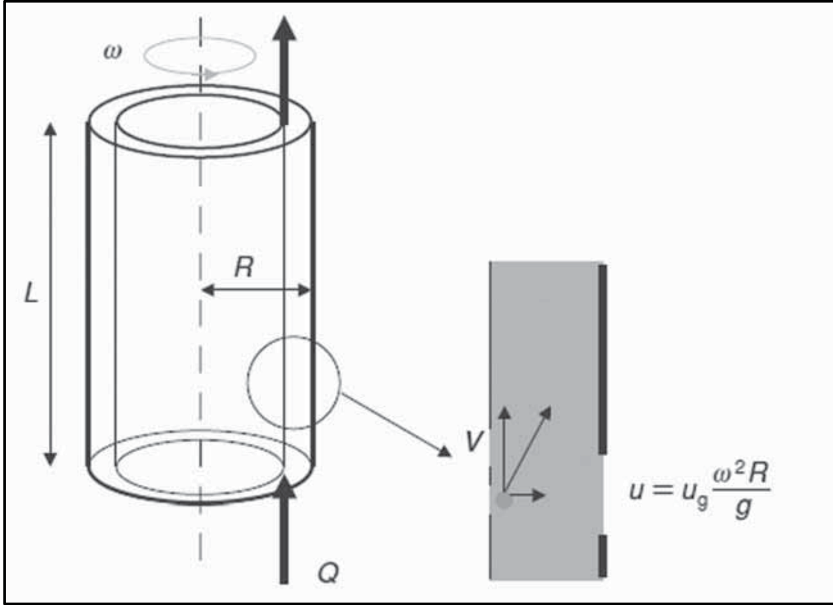
تحسب السرعة الزاوية بالمعادلة:

$$\omega = 2\pi N \qquad (4.9)$$

تمثل N عدد الدورات في وحدة الزمن. يمكن أن تكون قيمة التعجيل عدة آلاف المرات قيمة التعجيل الأرضي (g). إذا كان الفصل واضحاً بعد 10 دقائق من النبذ المركزي بسرعة 3000 g، عندها يمكن استخدام طريقة الفصل هذه على مستوى المصنع (في أجهزة النبذ المركزي الكبيرة يكون زمن المكوث (Residence) أقل، ولكن أيضاً تكون مسافة الترسيب أقل). يستخدم في العمليات التصنيعية، وبصورة شائعة، نوعان من أجهزة النبذ المركزي: جهاز النبذ المركزي الأنبوبي (Tubular centrifuge) وجهاز الأقراص المرصوفة (Disc Stack Centrifuge)، والشكل 4.9 يوضح جهاز النبذ المركزي الأنبوبي. سنستخدم هذا الجهاز لإيضاح مفهوم سيجما (Sigma concept) في تصميم أجهزة النبذ المركزي. يمكن اعتبار جهاز النبذ المركزي الأنبوبي كوعاء ترسيب موضوع على أحد جوانبه مع زيادة في قوة التعجيل. علينا في هذه الحالة أن نتأمل مع مكونين للسرعة: السرعة المحورية والسرعة القطرية.



الشكل 3.9: جهاز نبذ مركزي مختبري متأرجح (Swing centrifuge).



الشكل 4.9: جهاز نبذ مركزي أنبوبي.

يمكن حساب السرعة المحورية بالمعادلة:

$$U_{ax} = \frac{\phi_v}{\pi\left(r_o^2 - r_i^2\right)} = \frac{dl}{dt} \qquad (5.9)$$

حيث تمثل $\varnothing_v$ الإنتاج الحجمي، r_o القطر الخارجي للأنبوب، r_i القطر الداخلي للأنبوب و l المسافة بالاتجاه المحوري. أما السرعة القطرية فتحسب بالمعادلة:

$$U_r = U_\infty^c = \frac{dr}{dt} \qquad (6.9)$$

حيث تمثل U_∞^c سرعة الاستقرار الطرفية عند التعجيل المستخدم و r المسافة بالاتجاه القطري.

ربط هذه المعادلات مع بعضها البعض يعطي:

$$\frac{dl}{dr} = \frac{dl}{dt}\frac{dt}{dr} \tag{7.9}$$

ويعطي اشتقاقها:

$$\frac{dl}{dr} = \frac{U_{ax}}{U_r} = \frac{\phi_v}{\pi\left(r_o^2 - r_i^2\right)}\frac{g}{\omega^2 r U_\infty} \tag{8.9}$$

إجراء عملية التكامل للحصول على الطور الترسيبي المطلوب يعطي:

$$\int_o^L dl = \frac{\phi_v}{\pi\left(r_o^2 - r_i^2\right)}\frac{g}{\omega^2 U_\infty}\int_{r_i}^{r_o}\frac{1}{r}dr \tag{9.9}$$

بعدها وبإحلال قانون ستوكس (Stock's law) (الذي يعطي سرعة الاستقرار الطرفية لحبيبة في مائع) سيعطي الإنتاج الأقصى:

$$\phi_v = \frac{\pi\left(r_o^2 - r_i^2\right)}{\ln(r_o/r_i)}\frac{\omega^2 L}{g}\left[\frac{\Delta\rho d_p^2 g}{18\eta_l}\right] \tag{10.9}$$

لجهاز النبذ المركزي نفس تأثير المرسبات الجذبية (Gravitational Settler) مع مساحة Σ:

$$\phi_v = \Sigma U_\infty \tag{11.9}$$

باستخدام نفس الأسلوب، يمكن اشتقاق عوامل Σ لعدة أشكال هندسية:

$$\Sigma = \frac{\pi\omega^2}{g}L_{cyl}\frac{\left(r_o^2 - r_i^2\right)}{\ln(r_o/r_i)},$$ **أنبوبي** (12.9–أ)

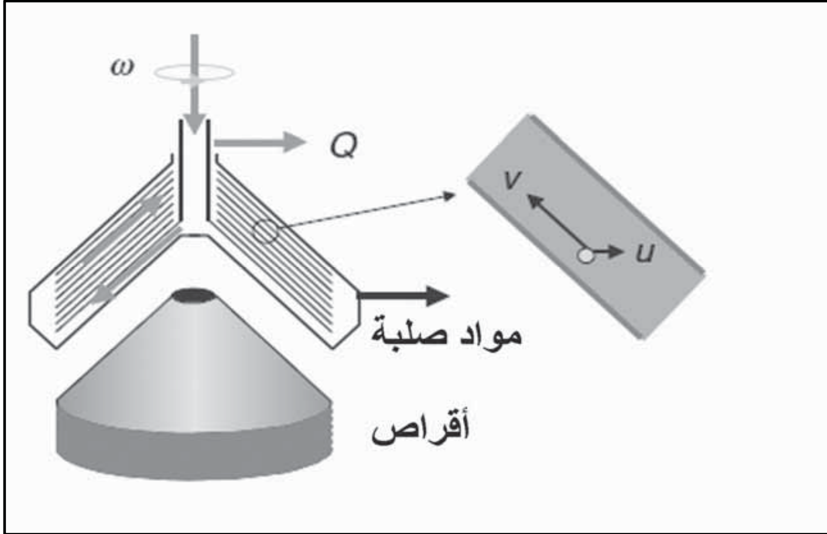
$$\Sigma = \frac{\pi\omega^2}{g}L_{con}r_i\frac{\left(r_o^2 - r_i^2\right)}{3},$$ **مخروطي** (12.9–ب)

$$\Sigma = \frac{\pi\omega^2}{g}\frac{2}{3}\frac{1}{\tan\alpha}\left(r_o^3 - r_i^3\right)z,$$ **مرصوفة** (12.9–ج)

يمكن مقارنة أجهزة النبذ المركزية ذات الأقراص المرصوفة بأوعية الترسيب المائلة ذات المساحة الكبيرة وقوة التعجيل المتزايدة، انظر الشكل 5.9. تحتوي أجهزة الأقراص المرصوفة على صفائح (أقراص) مخروطية الشكل ومرصوفة على مسافات قريبة من بعضها البعض (أقل من 1mm). يمكن بهذه الطريقة الحصول على سطوح كبيرة في أحجام صغيرة إلى حد! Σ=0.1 km^2. يدخل المغذي خلال المحور تحت الصفائح، ثم يسري إلى الخارج، ثم يعود راجعاً مرة أخرى.

تترك المواد الصلبة في الخارج، ويذهب المائع الرائق خلال شق دائري قرب المحور. يمكن للمواد الحيوية أن تسبب وبسهولة، ترسبات وانسدادات. لأجل الاستعمالات المعقمة يجب احتواء المواد بشكل جيد ويجب تعقيم الجهاز بالبخار. ويمكن تضخيم التجارب المختبرية (I) إلى المستوى التصنيعي (II) عن طريق حفظ نسبة الإنتاج والمساحة المكافئة ثابتة:

$$\left\{\frac{\phi_V}{\Sigma}\right\}^{I} = \left\{\frac{\phi_V}{\Sigma}\right\}^{II} \qquad (13.9)$$



الشكل 5.9: جهاز النبذ المركزي من نوع الأقراص المرصوفة.

الإطار 2.9 **فرض**

في الخطوات الأولى من عملية إنتاج الأنسولين، يكون فصل الصلب عن السائل أمراً ضرورياً. يشمل ذلك حصاد الخلايا واسترجاع الأجسام الضمنية واسترجاع

Trp E-Methp roinsulin المترسب. تمتلك الشركة عدة أجهزة نبذ مركزي من نوع الأقراص المرصوفة مزودة بفوهة إفراغ من نفس النوع المتوفر، وسنبحث فيما إذا كانت هذه ملاءمة وكم قرصاً سنحتاج. إن المكون المائي (الحر) للكتلة الحيوية المفرغة هو 60% حجماً لكي يسمح لها بالمرور خلال الفوهة. فجهاز النبذ المركزي ذي الأقراص المرصوفة له الأبعاد التالية:

عدد الأقراص $z = 200$ ، الزاوية نصف العمودية $\alpha = 50$ ،

نصف القطر الخارجي $ru = 0.25$ m، نصف القطر الداخلي $r_i = 0.08$ m،

المسافة بين الأقراص $\delta = 1$mm، سرعة الدوران القصوى (rpm) $= 5000$

خصائص المغذي

كثافة الوسط $\rho m = 1025$ kgm^{-3}، كثافة الصلب $\rho s = 1090$ kgm^{-3}،

لزوجة المرق $b = 0.035$ pa باسكال، لزوجة الوسط الخالي من المواد الصلبة

$m = 0.001$ pa ، تركيز المنتوج الذائب، $C_p = 1gI^{-1}$،

قطر الخلية $dp = 2x10^{-6}$ m، تركيز الخلايا $C = 0.025$ kg kg^{-1}

المغذي لكل دفعة $F = 25$ tons، جزء الماء الحر $\varepsilon = 1\text{-}12\%$

(1) احسب سعة جهاز النبذ المركزي المطلوب لإجراء العملية حسب أعلاه.

(2) كم جهازاً تحتاج إلى إجراء العملية إذا كان زمن الدورة (cycle) الواحدة هو خمس ساعات؟

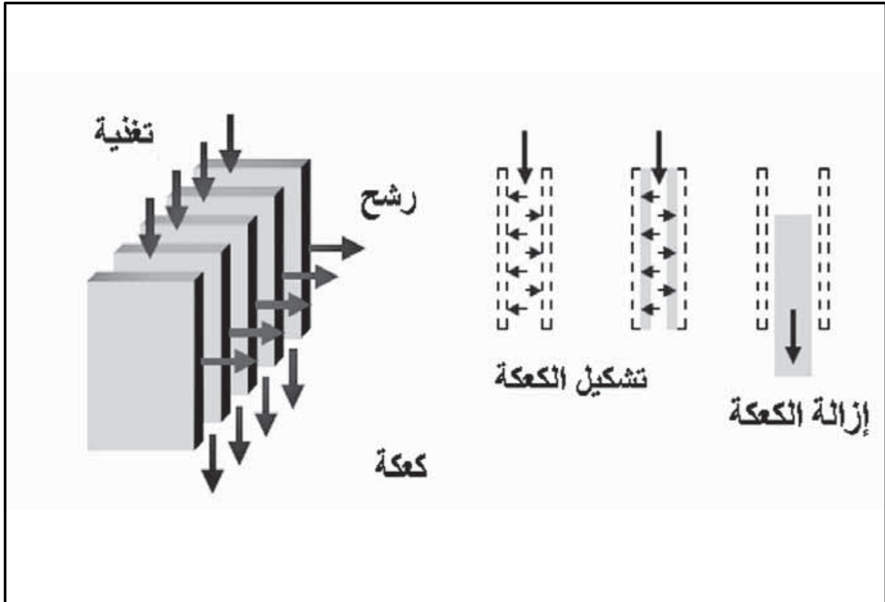
(3) كم سنفقد من المنتوج الذائب عن طريق مجرى الكتلة الحيوية؟

2.3.9 الترشيح Filtration

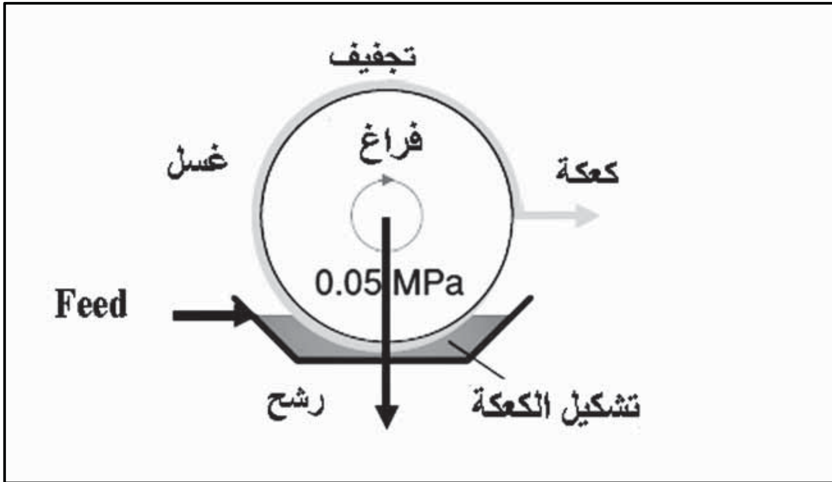
الطريقة الأخرى لفصل الحبيبات المعلقة في المائع هي الترشيح. تحجز الحبيبات بواسطة المرشح الذي هو عبارة عن نسيج أو لبّاد مسامي (Porous). تكون الحبيبات المتجمعة على سطح المرشح جسوراً فوق الثقوب فيما يعرف بكعكة المرشح (Filter cake): والتي ستعمل كجسر لعبور الحبيبات التالية. يدفع المائع خلال المرشح بواسطة الفارق في الضغط.

وعملياً، تستخدم طريقتان للترشيح: ترشيح الدفعة (Batch filtration) باستخدام مرشحات صفائحية، والترشيح المستمر (Continuous filtration)

باستخدام مرشحات الأسطوانة الدوارة المفرغة (Rotation drum vaccum filters). تحتوي المرشحات الصفائحية على عدد كبير من الأطر (Frames) الفارغة (الشكل 6.9). وتكون هذه الأطر مغطاة بالوسط المصنوع منه المرشح. يسري المائع من الخارج إلى الداخل: وتحجز الأجسام الصلبة على وسط المرشح بعد مرور زمن معين يملأ الفراغ بين الأطر بكعكة المرشح، ويزداد الانخفاض الضغطي للجهاز. عندها يجب تفكيك الأطر وإزالة الكعكعة. يمكن إجراء هذا الشيء بصورة أوتوماتيكية. إن مرشح الأسطوانة الدوارة المفرغة هو عبارة عن طبلة أسطوانية تدور حول محور أفقي (الشكل 7.9). تغطي مادة المرشح الجزء الخارجي للأسطوانة. تدور الأسطوانة ببطء في حوض يحتوي على المغذي، ويعمل الفراغ داخل الأسطوانة على شفط المائع إلى الداخل، تاركاً المواد الصلبة على شكل كعكة في الخارج. يغمر فقط الجزء السفلي من الأسطوانة في المغذي، أما بقية سطح الأسطوانة فيستخدم لغسل وتجفيف كعكة المرشح. بعد نهاية العملية تزال الكعكعة من الأسطوانة بواسطة سكين وتجمّع لأجل المعالجات اللاحقة.



الشكل 6.9: مبدأ الترشيح باستخدام الصفائح.



الشكل 7.9: مرشح الأسطوانة الدوارة.

تبدأ عملية تصميم المرشح في المختبر من خلال إجراء تجارب على نفس مادة المرشح التي ستستخدم في المصنع. يمكن إجراء هذه التجارب باستخدام قمع بوخنر (Büchner). يشفط المغذي خلال المرشح بوجود فرق ضغط ثابت (ΔP). يكون المرشح نظيفاً في البداية، وبهذا تكون عملية الترشيح سريعة، ولكن ما أن يبدأ تكون الكعكة على سطح المرشح حتى يبدأ معدل الترشيح بالتناقص. إن تسجيل حجم الراشح كدالة للزمن يعتبر معلومة قيمة لأجل عملية التضخيم. في النهاية، يقاس حجم كعكة المرشح. لوصف هذه التجربة يمكننا استخدام قانون دارسي (Darcy's law) للسريان خلال الأوساط المسامية.

$$\Delta P = \eta(R_c + R_m)\phi_v'' \tag{14.9}$$

حيث تمثل Rc مقاومة الكعكة، و Rm مقاومة الوسط و Øv تمثل دفق المائع خلال المرشح بوحدة m/s. ويكون الدفق:

$$\phi_v'' = \frac{dV_f}{dt}\frac{1}{A} \tag{15.9}$$

حيث تمثل V_f حجم الراشح المتجمع خلال زمن معين، A هي المساحة السطحية للمرشح. إن مقاومة الكعكة هي ناتج مقاومة الكعكة النوعية α وكتلة الكعكة لكل وحدة مساحة w:

$$R_c = \alpha w \qquad (16.9)$$

يمكن ربط w بالتركيز في المغذي بواسطة:

$$wA = cV_f \qquad (17.9)$$

حيث تمثل c تركيز المواد الصلبة في المرق. وبإحلال المعادلات (15.9) و (16.9) و (17.9) بالمعادلة (9-14) نحصل على:

$$\frac{dV_f}{dt} = \frac{\Delta pA}{\eta\alpha\frac{cV_f}{A} + \eta R_m} \qquad (\text{أ}-18.9)$$

$$\frac{dt}{dV_f} = \frac{\eta\alpha cV_f}{\Delta pA^2} + \frac{\eta R_m}{\Delta pA} \qquad (\text{ب}-18.9)$$

وبعملية التكامل:

$$\int_o^t dt = \frac{\eta\alpha cV_f}{\Delta pA^2}\int_o^{V_f} dV_f + \frac{\eta R_m}{\Delta pA}\int_o^{V_f} dV_f \qquad (19.9)$$

تنتج:

$$t = \frac{\eta\alpha c}{\Delta pA^2}\frac{1}{2}V_f^2 + \frac{\eta R_m}{\Delta pA}V_f \qquad (20.9)$$

وبرسم قيمة t/V_f مقابل V_f نحصل على خط مستقيم:

$$\frac{t}{V_f} = \frac{\eta \alpha c}{\Delta p A^2} \frac{1}{2} V_f + \frac{\eta R_m}{\Delta p A} \qquad (21.9)$$

يمكن الحصول على المقاومة النوعية للكعكة من المنحنى واستخدامها في تصميم وحدة صناعية أكبر. إن المقاومة النوعية للكعكة يمكن أن تكون لها قيم عالية $10^{12} - 10^{15}$ m/kg. إذا كانت مقاومة وسط الترشيح قليلة. عندها، يكون بالإمكان إيضاح أن حجم الراشح مقابل الزمن سيكون له السلوك التالي:

$$V_f \sim \sqrt{t} \qquad (22.9)$$

إن المقاومة النوعية للكعكة (α) هي دالة الجزء التالف (Void) من الكعكة، وهي أيضاً دالة قطر الحبيبة. فالجبيبات الصغيرة تعطي قيماً عالية لـــ α، وهذا هو السبب في صعوبة ترشيح حطام (Debris) الخلايا وحدَها. تحل المشكلة عادة عن طريق إضافة مواد مساعدة للمرشح: حبيبات خاملة مسامية بقطر 20-50 مايكرومتر. إن حجم مساعد المرشح المضاف يكون أكبر من حجم الحبيبات التي يراد فصلها. ويمكن تحديد الكمية المطلوبة فقط عن طريق التجربة. وعادة يضاف مساعد المرشح على مرحلتين: يضاف أولاً حجم صغير كغطاء أولي (Pre-coat) لوسط الترشيح، ويخلط الحجم الباقي والأكبر مع المغذي. إن مساعد المرشح المستنفذ هو عبارة عن فضلات قد تحتوي على كمية معقولة من المنتوج. هذا وتعتمد المقاومة النوعية للكعكة α كذلك على قطر القنوات التي يمكن زيادتها من خلال إضافة مادة مخثرة صوفية الملمس (Flocculent)، أو بتغيير الرقم الهيدروجيني، أو القوة الأيونية للمغذي.

4.9 التركيز Concentration

يبقى المغذي مخففاً بعد عملية التصفية، ويجب تركيزه قبل استخلاص وتنقية المنتوج. وهذا يعني عادة إزالة الماء. كما يمكن أيضاً لعملية التركيز أن تنقي مجرى المنتوج، وأحياناً يكون ذلك كافياً للحصول على منتوج نهائي بنقاوة مرغوبة.

الإطار (3.9) فرض

يمكن فصل الصلب عن المانع باستخدام مرشح الأسطوانة الدوارة المفرغة (Rotary vacuum drum filter). وللحصول على نتائج تساهم في تصميم مرشحات على مستوى العمليات الإنتاجية الكبيرة، يتم ترشيح للــ Streptomyces باستخدام قمع بوخنر، والذي له مساحة ترشيح دائرية ذات قطر يبلغ 20 سم. الفارق في الضغط (Δp) خلال الكعكة هو 0.7 bar (ترشيح تفريغ).

نتائج أخرى: كثافة المرق $P_h = 1050\ kg/m^3$،

لزوجة المرق الديناميكية باسكال $n = 0.032$ ، تركيز الكتلة الحيوية $C = 30\ kg/m^3$.

تجربة دفعة أنتجت حجوم الراشح التالية كدالة للوقت:

الزمن t (ثانية): 3100, 2479, 2116, 1719, 1481, 1204, 940, 727, 507, 320

حجم الراشح (ml) Vr: 100، 150، 200، 250، 300، 350، 400، 450، 500، 550، 600.

(أ) إرسم منحنى لقيم التجربة الخاصة بـــ t/Vr مقابل Vr.

(ب) حدد متوسط مقاومة الكعكة الخاصة α (بالـــ m/kg) ومقاومة الوسط R_m (بالـــ m/kg). من خلال هذه النتائج يمكن تصميم مرشح الأسطوانة الدوارة المفرغة. الفراغ هنا أعلى Δp هو 0.9 bar. أبعاد مرشح الأسطوانة هي: القطر $(D) = 2m$، الطول $(L) = 4m$، زاوية قسم الترشيح $\Delta y = 0.6\ \pi\ rad$.

(ج) احسب معدل الترشيح الأقصى الذي يمكن الحصول عليه نظرياً من استخدام مرشح الأسطوانة الدوارة المفرغة. الحد الأعلى للدورات بالدقيقة هو 5.

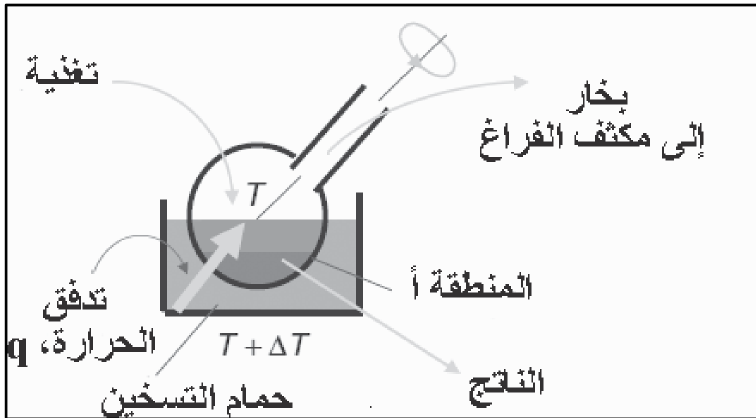
(د) إن خطوات فصل الصلب عن المانع في عملية إنتاج الأنسولين يجب أن تكون قادرة على معالجة 50 طن في الدفعة الواحدة. هل يمكن استخدام هذا المرشح في عملية الأنسولين؟

1.4.9 التبخر Evaporation

إن أقدم وأبسط طريقة لتركيز سائل ما هي تبخير الماء أو المذيب منه. تميل المنتوجات الحيوية إلى عدم الاستقرار عادة، لذا يتوجب الحفاظ على درجة حرارة وزمن تعريض منخفضين، ويتم الحفاظ على درجة حرارة منخفضة بالعمل تحت ضغط منخفض. فعند العمل في درجة حرارة $40\ ^oC$ يجب اختزال الضغط إلى 10 kpa. يتطلب تصميم خطوة التبخر إلى إجراء تجارب مختبرية. يمكن

إجراء هذه التجارب باستخدام مبخر غشائي دوار مفرغ (Rotating vacuum film evaporator) متكون من دورق زجاجي مغمور في حمام تسخين ومربوط بنظام التفريغ (الشكل 8.9). يدور الدورق (Bowl) ببطء في حمام التسخين لإعطاء تسخين متساوٍ لعموم حجم السائل. خلال التجربة نقيس درجة حرارة الحمام والمنتوج وكذلك نقيس كمية المادة المتكثفة (Condensate)، وإذا كان ذلك مناسباً يتم قياس فعالية المنتوج كدالة للزمن. كما يمكن الحصول على معلومات قيمة من هذه التجربة مثل درجة السماكة الممكنة (Degree of thickening)، وكمية المنتوج التالف، ودرجة تكوين الرغوة أثناء الغليان. وكذلك، الحصول على فكرة عامة عن الدفق الحراري المسموح به خلال الجدار.

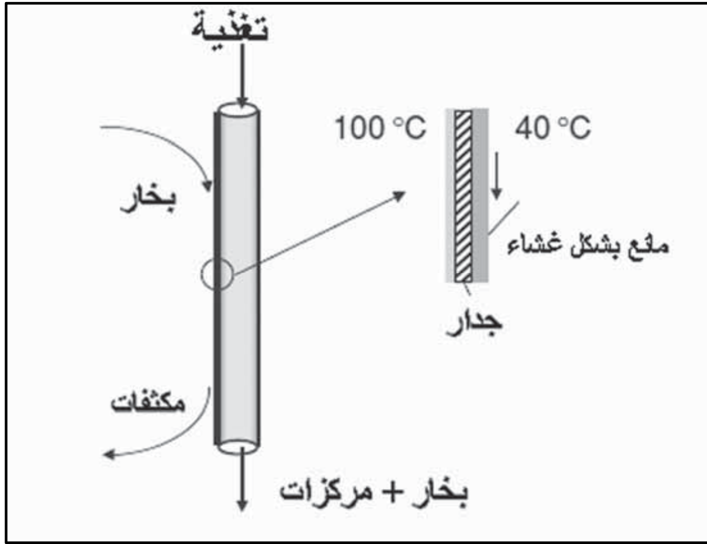
في الأجهزة التي تستخدم في المصنع يضاف المغذي غالباً كمائع ينساب على شكل غشاء داخل أنبوب عمودي (الشكل 9.9 والشكل 10.9). فإن الغشاء الرقيق يسخن بسرعة، مما يقلل من زمن المكوث في الأنبوب.



الشكل 8.9: مبخر غشائي دوار مفرغ.

يتم تجهيز الحرارة في هذه الحالة بواسطة بخار يتكثف على السطح الخارجي للأنبوب. يكون الضغط في الخارج أعلى مما هو عليه في الداخل مما يسمح بدرجة حرارة أعلى في الخارج.

يتم فصل المائع المركز والبخار خلف المبخرة، ومن ثم يكثف البخار بواسطة التبادل الحراري.



الشكل 9.9: مبخر أنبوبي على مستوى المصنع.

خلال تكثيف 1 kg من البخار تتحرر طاقة مقدارها 2.2 ميغاجول (MJ). تكون هذه الطاقة كافية لتبخير 1 kg من الماء أو عدة كيلوغرامات من المذيب العضوي. إن توليد واستخدام البخار عملية مكلفة، ويجب إبقاء هذه الكلفة في حدها الأدنى. ويمكن تحقيق ذلك من خلال توظيف مبخرات متعددة المراحل تستخدم البخار المستحصل لتبخير المغذي المائع. إن الاختزال في تكاليف التشغيل (البخار) يقابلها زيادة في التكاليف الثابتة (الأجهزة)، وهنالك حدود لدرجة تكثيف المائع المعالج: فإذا زادت المحتويات الصلبة بشكل كبير فإن المائع لا يستطيع السريان. إن مبخرات الغشاء المتحدر الأنبوبية (Tubular falling film evaporators) ملائمة لمعاملة المنتوجات اللزجة، والمحاليل الحساسة للحرارة (كالأنزيمات)، والمنتوجات ذات الرغوة. هذا ويتوفر العديد من أنواع المبخرات التي يمكن استعمالها صناعياً:

- المبخرات العمودية طويلة الأنبوب (الدوران الطبيعي 1-13 kW/m/K) الدوران المجبر $2\text{-}13\ kW/m^2/K$.
- المبخرات قصيرة الأنبوب ($0.5\text{-}2.5\ kW/m^2/K$).

- مبخرات الغشاء المهزوز (Agitated) (2-5 kW/m/K).
- مبخرات النبذ المركزي ($3-10\ kW/m^2/K$).

يعتمد اختبار هذه المبخرات على الأسس التالية:

- القدرة على التعامل مع مدى واسع من لزوجة المنتوج (1-10000 mPa.s).
- القدرة على التعامل مع المنتوجات الحساسة للحرارة.
- تكوين محدود للقشرة (Scale).
- توحيل (Fouling) محدود.
- رغوة محدودة.

2.4.9 الترسيب Precipitation

يمكن استخدام الترسيب في مراحل متعددة من العملية. في البداية يمكن لعملية الترسيب أن تزيل الماء و/أو الملح لتعطي ناتجاً وسطياً مستقراً. كما يمكن استخدام الترسيب خلال عملية الاسترجاع (Recovery) لغرض التركيز، مثلاً قبل خطوة فحص الكروماتوغرافيا. يمكن استعمال الترسيب في االمرحلة النهائية للحصول على منتوج نهائي صلب. أثناء الترسيب يتم خفض قابلية الذوبان للمنتوج غير المرغوب به حتى يصل المحلول إلى حالة فوق التشبع ويترسب المنتوج. يفصل الراسب الصلب عن المحلول عن طريق الاستقرار أو جهاز النبذ المركزي أو الترشيح.

يمكن إجراء الترسيب كذلك بأسلوب التجزئة (Fractionation) (الراسب المتكون يحتوي على أجزاء مختلفة لنواتج مختلفة). يتم تقليل قابلية الذوبان غالباً عن طريق إضافة الأملاح، وبالذات $(NH_4)_2\ SO_4$ ، أو المذيباب العضوية مثل الأسيتون أو الكحول. وهناك حاجة إلى أحجام كبيرة من هذه المرسبات، مما يسبب تكوين كميات كبيرة من الفضلات.

للأملاح مزايا عديدة، منها:

- يكون مسخ البروتينات (Denaturation) محدوداً.

- يمكن إجراء الترسيب بدرجة حرارة الغرفة.
- يمكن الحصول على راسب نقي نسبياً، وفي خطوات قليلة.

وللأملاح ثلاث مساوئ، هي:

- إنتاج كميات كبيرة من فضلات الأملاح (Waste stream).
- يجب إزالة الأملاح الموجودة في المنتوج في مراحل لاحقة (بوساطة الترشيح الفائق، على سبيل المثال).

الإطار 9.4 فرض

يجب تركيز منتوج مانع من مستخلص الخميرة (yeast extract) مقداره 0.2 kg/s بطريقة التبخر. ويتوجب زيادة الجزء الصلب من 0.2 إلى 0.5% بطريقة الوزن. أجريت القياسات في تجربة على مستوى تصنيع أولي ريادي تحت الظروف التالية:

المغذي: معدل السريان $F = 0.05$ kg/s، كتلة المادة الجافة $W_f = 0.2$ درجة الحرارة $T_f = 40$ ˚C.

المادة المركزة: معدل السريان $C = 0.02$ kg/s ، درجة الحرارة $Tc = 40$ ˚C.

الكتلة التجزيئية ($W_f = 0.5$) سطح المبخرة الموعودة: $A_B = 0.5$ m^2،

احسب مقدار البخار المستعمل وسطح المبخرة المطلوب في المصنع إذا كان لدينا بخار تغذية أعلى بأربع مرات مما هو عليه في المختبر. سنستخدم في المصنع الحقيقي بخار بدرجة حرارة 140 ˚C. افترض وجود معاملات نقل حراري متساوية استخدم $q = U.\Delta T$

إن استخدام المذيبات كمواد مرسبة يسبب مسخاً (Denaturation) شديداً للبروتينات، ويخلق الحاجة إلى إجراء المعالجة بدرجة حرارة 0-5 ˚C (بلازما الإنسان - 10˚C-)، علماً بأن استرجاع المذيبات أمر سهل.

تستخدم عملية الترسيب بشكل واسع في استرجاع البروتينات. لا يمكن توقع قابلية ذوبان البروتينات بسهولة، على الرغم من إمكانية فهم سلوكها الوصفي.

يتكون البروتين من أحماض أمينية حمضية وقاعدية. وتتأين هذه المجاميع في البيئة المائية، وإن شحنتها تعتمد على الرقم الهيدروجيني للمحلول (الشكل 11.9). عند قيم الرقم الهيدروجيني العالية تتأين المجاميع الحمضية وتكون شحنة البروتين سالبة. أما في قيم pH الواطئة فيكون البروتين موجب الشحنة. وهنالك قيمة محددة للـــ pH تسمى نقطة التعادل (Isoelectric, point, pI) يكون فيها معدل شحنة البروتين مساوياً للصفر. عند هذه النقطة لا تنفّر (Repel) البروتينات عن بعضها بعضاً، بل يمكن أن تتشابك مع بعضها البعض وتترسب. غالباً ما تجري عمليات الترسيب في الأحواض المخفوقة، وأن التجارب المختبرية يمكن أن تجري لتصميم عمليات الترسيب على المستوى المضخم (صناعي ريادي). ولأجل حصول ذلك فإن هندسة الأحواض المستعملة على المستويين المختبري والمضخم يجب أن تكون هي نفسها. ويمكن استخدامها في خزان مخفوق قياسي مزود بحواجز مع توربين روشتون (انظر الفصل السابع). علاوة على الجانب الهندسي، فإن تبدد القدرة التي توصف بواسطة عدد القدرة P، ويتم تحديدها من خلال سرعة الخفق N، وكثافة المائع (PL) وقطر الخفاق d_s:

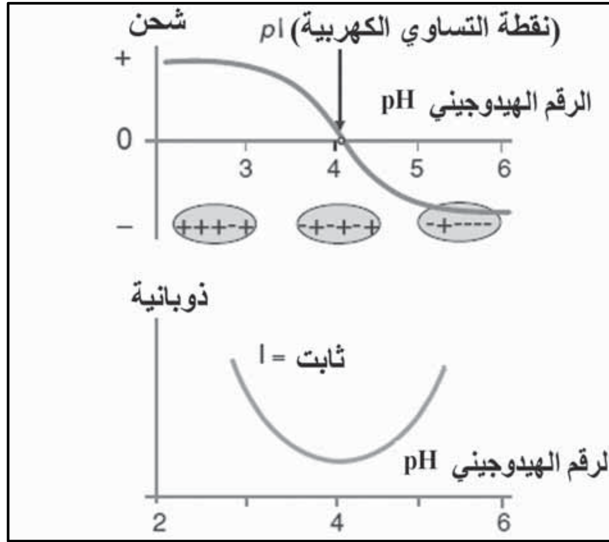
$$P = 5\rho_L N^3 d_s^5 \tag{23.9}$$

لمكونات الحوض كتلة (M) من:

$$M = \rho_L \frac{\pi}{4} D^2 H = \rho \frac{\pi}{4} D^3 \tag{24.9}$$

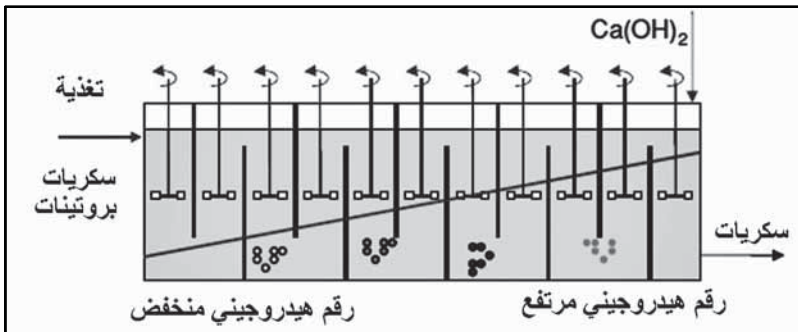
يعطي:

$$\frac{P}{M} = 0.026 N^3 D^2 \tag{25.9}$$



الشكل 11.9: الشحنة وقابلية الذوبان للبروتينات.

يساوي الخفق السريع حوالى 1W/kg، في حين أن الخفق البطيء يكون أقل من ذلك بما يقارب مئة مرة. أفضل عمليات الترسيب هي تلك التي تجري بعدة خطوات. يضاف المرسب قرب الخفاق، ويخفق الحوض بسرعة لضمان الخلط الجيد. تكون الحبيبات المتكونة في البداية صغيرة ولا تعاني القص (Shear) العالي. لأجل إعطاء الفرصة للجيبات أن تكبر، تخفض سرعة الخفق. في النهاية توقف عملية الخفق لتسمح بترسب المواد الصلبة، وتبقى الأشياء التالية على حالها في المصانع الصغيرة ومصانع التصخميم: دخل القدرة (kg)، وقت إضافة الراسب وأزمان الخلط المختلفة.



الشكل 12.9: ترسيب البروتينات عند نقطة التعادل الكهربية.

الإطار 5.9 مثال

تمثل عملية تنقية السكر مثالاً عملياً على الترسيب بالتعادل الكهربي (isoelectrical). فبعد غسل الشمندر السكري وطحنه ومن ثم ترشيحه في عملية التنقية نحصل على محلول من السكر والبروتين. ويحتوي الخليط هذا على بروتينات ذات نقاط تعادل كهربية مختلفة. ولإزالة هذه البروتينات تحتاج العملية الصناعية إلى ممارسة أنماط من pH مختلفة. ويمكن تحقيق ذلك باستخدام وعاء أفقي من غرف صغيرة (baffled/compartmentalized horizontal vessel) يتم تحريك السائل في هذه الغرف مع السماح بشيء من الدفق الخلفي (back flow) وتحقن مادة قاعدية (base) في نهاية المفاعل لضبط الـــ pH النهائي. وتحقق هذه الطريقة سيماء تدرجياً للـــ pH في عموم المفاعل، يحتوي على كافة قيم pI التي تسبب ترسيب البروتينات المختلفة في كافة مراحل التنقية المعتمدة (الشكل 12.9).

3.4.9 الترشيح الفائق Ultrafiltration

يمكن إجراء عملية التركيز باستخدام الأغشية (الشكل 13.9). ويستعمل غالباً، نوعان من الأغشية في التقنية الحيوية. أغشية الترشيح المجهري (Microfiltration membranes (MF)، وأغشية الترشيح الفائق (Ultrafiltration membrane UF). تحتوي أغشية الترشيح المجهري على ثقوب (Pores) تتراوح أقطارها بين 0.2 – 0.5 مايكرومتر، فهي بالتالي تمنع الخلايا من المرور. يشابه الترشيح المجهري عملية الترشيح العادية وتطبق عليه النظرية المذكورة في الفقرة 9-3. أما أغشية الترشيح الفائق فتحتوي على ثقوب تبلغ أقطارها حوالى 10 نانومتر، وبالتالي فإنها تمنع البروتينات من المرور، ولكنها تسمح بمرور الماء والأملاح. إن الأغشية المصنوعة على شكل أنابيب مسامية تبلغ أقطارها 1-5 mm هي الأكثر شيوعاً. وإن غلافاً رقيقاً يحيط بسطح الأنبوب هو الذي يمثل الغشاء الحقيقي. يمكن أن تكون هذه الأنابيب مصنوعة من بوليمر مسامي (مثل الإسفنجة) أو من كربون أو سيراميك مساميين.

يمكن استخدام أغشية الترشيح الفائق (UF) بطريقتين: تعميق التركيز، أو غسل الأملاح من المنتوج (بعملية الديلزة الترشيحية – Diafiltration). إن الاختلاف الرئيسي بين الترشيح الفائق والترشيح العادي (أو ما يسمى ترشيح النهاية الميتة Dead end) هو في نوع السريان على سطح الغشاء. فخلال الترشيح الفائق، يسري المائع الحاوي على المواد الصلبة على طول الغشاء (ولهذا يستخدم مصطلح ترشيح السريان العرضي – Cross – flow filtration) وعادة ما يستخدم فرق ضغط يبلغ عدة مئات (kPa) على جانبي الغشاء. إن هذا الفرق في الضغط هو القوة المحركة لنقل الماء والأملاح خلال الغشاء. إن دفق (Flux) الغشاء (J) يكون صغيراً ويبلغ حوالى 10×10^{-6} m/s. وإن زيادة الضغط عبر الغشاء يزيد من الدفق مبدئياً، ولكن إلى حدٍ معين.

ينتقل البروتين نحو الغشاء بواسطة الماء حيث يتجمع هناك. وعند فرق ضغط معين يتراكم البروتين على الغشاء. إن زيادة فرق الضغط أكثر من ذلك لا يزيد الدفق، ولكن يؤدي إلى زيادة سمك الطبقة الهلامية. يمكن اشتقاق معادلة للدفق من خلال استعمال توازن كتلي (Mass balance) على غشاء قرب المرشح (الشكل 14.9).

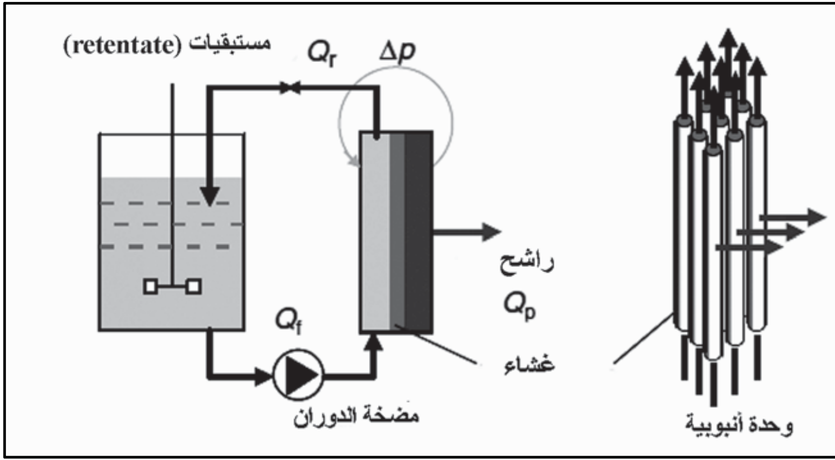
$$J\,(C - C_p) = -D\frac{dC}{dx} \qquad (26.9)$$

تمثل C تركيز البروتين وتمثل C_p تركيز البروتين في الجانب النافذ. فصل المتغايرات والتكامل وتعريف معامل النقل الكتلي (k) من حيث سمك الغشاء δ ومعامل الانتشار D تمثل بـــ:

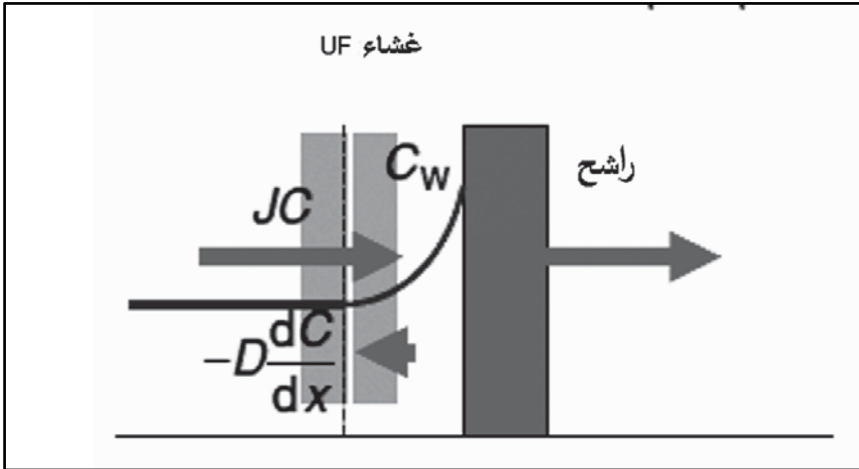
$$k = \frac{D}{\delta} \qquad (27.9)$$

وإن استبعاد تركيز البرويتن في الراشح يقود إلى:

$$J = k \ln\left(\frac{C_w}{C_b}\right) \qquad (28.9)$$



الشكل 13.9: التركيز بواسطة الترشيح الفائق.



الشكل 14.9: التوازن الكتلي على الغشاء.

يستنتج من المعادلة (28.9) أن الدفق يقل بزيادة التركيز العام. عندما تكون $C = C_W$ تصبح قيمة الدفق مساوية إلى صفر. يمكن قياس العلاقة بين الدفق والتركيز بسهولة من خلال تجربة مختبرية وباستخدام أنبوب غشائي واحد. إن هذا يتطلب إجراء تجربة دفعة واحدة (Single batch exp) التي من خلالها يمكن تحديد قيم معامل النقل الكتلي (k) وتركيز الهلام (C_W). باستخدام هذه النتائج يمكن تصميم أجهزة أكبر باستخدام عدد أكبر من الأنابيب الغشائية. في النظام الهلامي (Gel regime)، يمكن زيادة الدفق بزيادة السريان في الأنبوب وحسب المعادلة

(29.9)، يمكن استخدام سرعات سريان عرضي (v) تتراوح بين 3-1 m/s ، لحساب معامل النقل الكتلي الناتج، وبشكل تقريبي بواسطة المعادلة:

$$k = 10^{-5}\, v \qquad (29.9)$$

الإطار 6.9 فرض

محلول أنزيم تم تركيزه بواسطة الترشيح الفائق. كان الدفق كدالة للتركيز مساوياً إلى:

C_b (mmol l^{-1}): 1.0, 1.5, 3.0, 5.0, 8.0
L (µm s^{-1}): 14.0, 11.5, 7.7, 4.9, 2.3

احسب معامل النقل الكتلي (K) وتركيز الهلام (C_w).

5.9 الاستخلاص Extraction

بعد تحرير المنتوج من الخلية وإمراره بعمليات التصفية والتركيز، يصبح المنتوج الملوث متاحاً للمعالجات اللاحقة. يمكن تمييز مجموعتين رئيسيتين لعمليات الاستخلاص في معالجات أصل المجرى للمنتوجات الحيوية: مجموعة تستخدم للمنتجات الكبيرة مثل حمض الستريك (citric acid) والأنزيمات والبنسلين. والمجموعة التي تستخدم للعمليات الصيدلانية على المستوى الصغير.

يتطرق هذا الجزء من الكتاب إلى عمليات الإنتاج الكبيرة (Bulk processes). فخلال عملية التنقية للمنتجات الكبيرة لا تكون النقاوة القصوى مطلوبة. وعادة يسمح بوجود نسبة مئوية قليلة من الملوثات. يمكن تشخيص تقنيتين مهمتين، وهما استخلاص سائل – سائل (Liquid-liquid extraction) والبلورة (Crystallisation)، وكلاهما يستخدم طوراً مساعداً يستخلص بواسطته مكوناً معيناً مختاراً من الخليط.

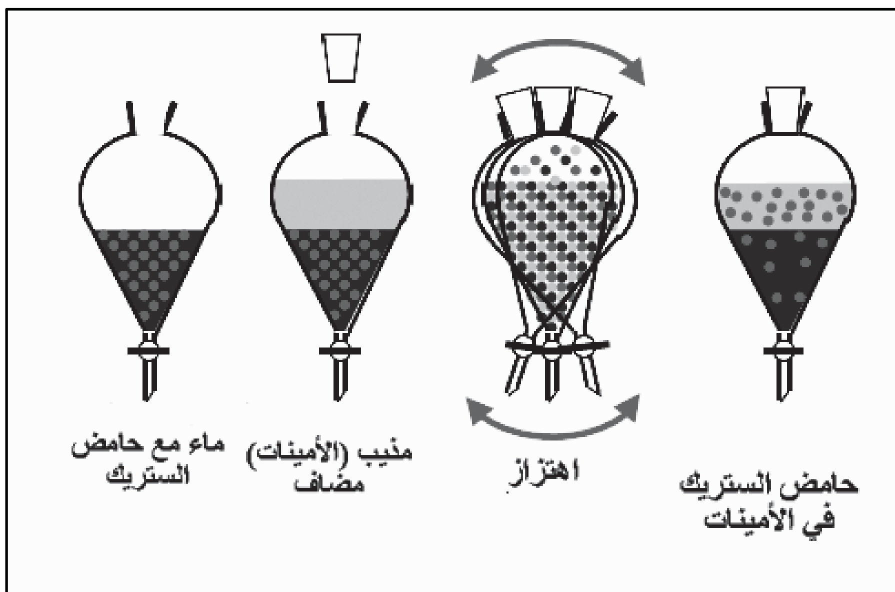
1.5.9 الاستخلاص Extraction

فيما يلي نماذج من المركبات المنقاة بواسطة الاستخلاص:

- الكحولات والكيتونات (-2 بروبانول، بيوتانول، أسيتون).
- أحماض الكربوكسيليك والأحماض الأمينية (الخليك، الجلوكونيك، اللاكتيك، الستريك، بعض الأحماض الأمينية الكارهة للماء).
- مضادات الحيوية (بنسلين، لينكومايسين، تتراسايكلين، سيفالوسبورين باستراسين).
- فيتامينات (A,B,C).
- مكونات غذائية (طعم ورائحة، أحماض دهنية من الزيوت والدهون القابلة للأكل، كافايين).
- الألكالويدات (Alkaloids) والستيرويدات (Steroids) (بريدنيسوليون، كوداين، مورفين، كوينين، ستركين، تاكسول).
- الببتدات والبروتينات (الأنسولين، الانترفيرون).

يمكن إجراء الاستخلاص في المختبر، وكما هو موضح بالشكل (15.9).

غالباً ما يكون الاستخلاص أحادي المرحلة غير كافٍ. وعليه، فقد تكون هناك حاجة إلى عدة خطوات. بالنسبة إلى الجزيئات الصغيرة، مثل حمض الستريك والبنسلين، تستعمل عادة مذيبات عضوية مثل البيوتانول، واسيتات البيوتيل، أو أمينات أكبر. أما الجزيئات الحيوية الكبيرة والمعقدة فيمكن استخلاصها بطريقة الاستخلاص المائي ثنائي الطور. تتكون هذه الأنظمة من خليط مائي مكون من ملح ($MgSO_4$ على سبيل المثال) وبوليمر (مثل بولي ايثيلين جلايكول PEG)، أو مكون من ملح ونوعين من البوليمر (بولي ايثيلين جلايكول وديكستران). في مديات تراكيز معينة، تنفصل هذه الخلائط المائية إلى طورين. يقع الطور الكثيف في الأسفل ويحتوي على معظم الملح، في حين يحتوي الطور العلوي على البوليمر بصورة رئيسية. كلا النظامين لا يسببان ضرراً كبيراً للبروتينات الحساسة. وهنالك أربعة عوامل تتحكم بعملية الاستخلاص، هي:



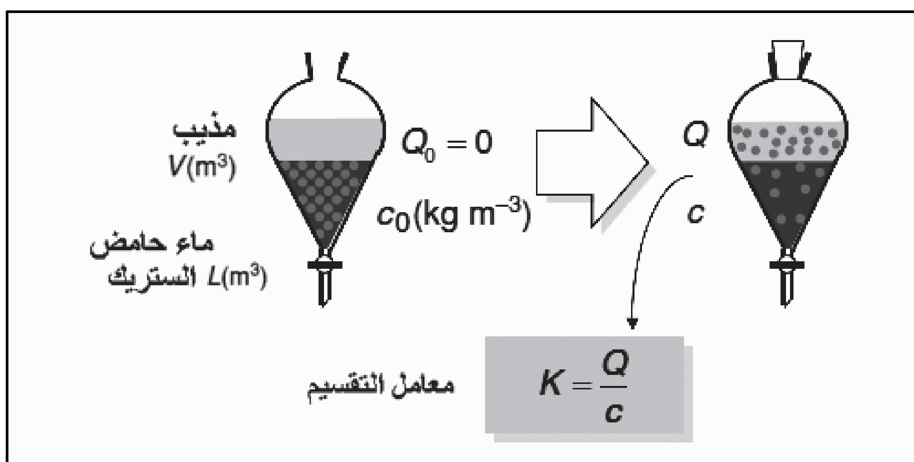
الشكل 15.9: مراحل الاستخلاص في المختبر.

- التوازنات الكتلية (الكلي، للطوري، والموضعي).
- توازن الطور والتفاعل (K).
- الهيدروديناميك.
- معدلات النقل الكتلي والتفاعل (k).

لتوضيح العملية سنأخذ مثالاً وهو استخلاص حمض الستريك باستخدام مذيب عضوي. بإمكان تجربة مختبرية بسيطة أن توضح إذا كان استخدام الاستخلاص ممكناً. في هذه الحالة توضع كمية من مائع المخمر المصفى، $L(m^3)$، في قمع فصل (Separation funnel). تركيز حمض الستريك هو C_o (kg/m^3). بعدها يضاف حجم من محلول أميني نظيف $V(m^3)$ ثم يغلق القمع ويرج. سيتحول حمض الستريك إلى الطور العضوي (انظر الشكل 16.9). بعد مرور زمن معين يصل النظام إلى حالة التوازن. بعد الاستقرار، تحلل محتويات حمض الستريك في كلا الطورين والنسبة تعطي معامل الفصل (Partitioning coefficient) أو (K). يجب أن تكون قيمة K عالية لكي تكون عملية

الاستخلاص مجدية للاستخدام. كما أن معامل الفصل للملوثات يجب أن يكون منخفضاً. يعتمد المعامل على:

- طبيعة وتركيز النوع (Species).
- القوة الأيونية (I).
- الرقم الهيدروجيني (pH).
- درجة الحرارة.
- نوع المذيب.



الشكل 16.9: الفصل خلال عملية الاستخلاص.

بالنسبة إلى التقدير الأول، يمكن اعتبار قيمة معامل الفصل كثابت. تكون نسبة كميات حمض الستريك في الطورين معروفة، وكذلك عامل الفصل (أو الاستخلاص) (S):

$$S = \frac{QV}{cL} = K\frac{V}{L} \qquad (30.9)$$

إذا كانت Si>1، فإن المكون يتحرك بشكل رئيسي نحو الطور المساعد، أما إذا كانت $Si < 1$ فإن المكون سيتحرك مع المغذي (Feed).

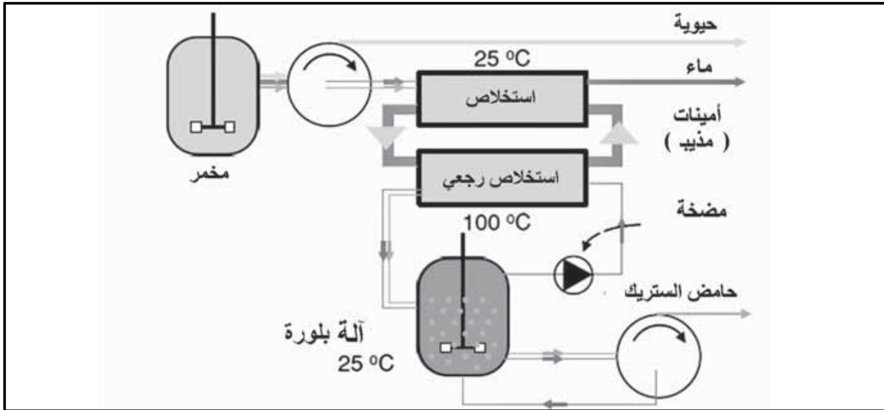
2.5.9 التبلور Crystallisation

عندما يكون المحلول عالي التشبع، فإن المذيب سيحتوي على منتوج أكثر مقارنةً بحال التوازن، وكنتيجة لذلك يتبلور المنتوج. تعزل البلورات بواسطة الترشيح أو النبذ المركزي. وهذا بدورة ينتج محصولاً نقياً بشكل معقول. وغالباً ما تؤدي خطوة تبلور واحدة إلى إنتاج درجة النقاوة المرغوبة، ولكن قد تبقى في المحلول كميات كبيرة من المنتوج. وهنالك طريقتان للحصول على محلول عالي التشبع هما التبريد (خفض قابلية ذوبان المنتوج) والتبخير (زيادة تركيز المنتوج). تشبه عملية التبلور عملية الترسيب، ولكنها تختلف عنها بطريقة الحصول على المحلول عالي التشبع. فإن عملية التبلور لا تستخدم المواد المضافة، وهي بذلك تعد التقنية الأقدم والأكثر شيوعاً.

هذا ويتم إنتاج كميات كبيرة تزيد على 100 ميلون طن سنوياً من الأملاح اللاعضوية مثل كبريتات الصوديوم والأمونيوم، ومركبات عضوية معينة مثل السكروز والجلوكوز. وتسوق معظم المواد الصيدلانية والكيميائية العضوية الدقيقة على شكل بلورات. إن عملية التبلور مهمة لثلاثة أسباب:

- غالباً ما تكون البلورات نقية جداً – وهذا شيء مهم جداً في الخطوة النهائية لعملية التنقية الفائقة (Ultrapurification).
- إنتاج بلورات متجانسة يسرع من الخطوات النهائية اللاحقة مثل الترشيح والتجفيف.
- إنها تحسن من مظهر المنتوج – الذي يكون مهماً لتقبل العميل.

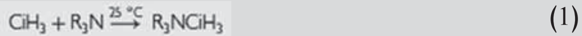
إن عملية التبلور على مستوى المختبر عملية سهلة الإجراء. ولكن التبلور على المستويات الإنتاجية الضخمة يعتبر فناً أكثر مما هو علماً. ويعود السبب في ذلك إلى المحددات الهندسية لجهاز التبلور وإلى النقل الحراري والكتلي المتزامن في نظام متعدد الأطوار والمكونات، والذي لا يكون مستقراً من الناحية الثرموداياناميكية. علاوة على ذلك، فإن وجود كميات من الشوائب، وإن كانت ضئيلة، يكون لها تأثير كبير في العملية الإنتاجية.



الشكل 17.9: عملية استرجاع حمض الستريك.

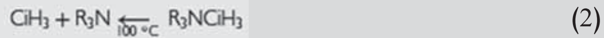
الإطار 9.7 مثال تنقية

سنستخدم إنتاج حمض الستريك كمثال لإيضاح نواحي معينة في تنقية المنتوج. يستعمل حمض الستريك في صناعة الغذاء: مثل المشروبات المكربنة، والمشروبات المعلبة، ومشروبات الفاكهة والمربيات، والهلام، والفاكهة المعلبة. يستعمل كذلك في الزيوت النباتية لحفظ الألوان والنكهة ومحتوى الفيتامينات للخضار والفاكهة الطازجة والمجمدة. ومن التطبيقات الأخرى لهذا حمض تنظيف المراجل (Boilers) والمبادلات الحرارية. إن قابليته المخلبية (chelating) تساعد في إزالة الحراشف القشور (scales) وفي جعل استخدام الحمض الستريك كمادة مكونة للمنظمات ولا سيما في أشكالها المانعة. يمكن لحمض الستريك إزالة ثاني أكسيد الكبريت من الغازات كما أنه يرتبط مخلبياً بالمغذيات المجهرية في الأسمدة. تستخدم عمليات الاستخلاص والبلّورة (شكل 17.9) في إنتاج حمض الستريك. فهو منتوج خارج خلوي (Extracellular) للفطر الخيطي Aspergillus niger المغذي بواسطة مرشح دوار مفرغ، ويحتوي المانع المعالج على عدد كبير من الملوثات بالإضافة إلى حمض الستريك. ولهذا فإن الحمض يستخلص بوساطة مزيج أميني رباعي غير ذائب بالماء (water insoluble tertiary amine). يتفاعل الأمين بشكل عكسي مع الحمض كالآتي:



$$CiH_3 + R_3N \xrightarrow{25\ ^\circ C} R_3NCiH_3 \quad (1)$$

إن معظم الملوثات في هذه العملية لا تتفاعل. يعامل طور الأمين بعد الإستقرار وفصل الطورين، مع ماء جديد ونظيف وبدرجة حرارة عالية، حيث يتجه التفاعل بالاتجاه الآخر كالآتي:



$$CiH_3 + R_3N \xleftarrow[100\ ^\circ C]{} R_3NCiH_3 \quad (2)$$

يستخلص حمض الستريك بعدئذٍ بالطور المائي رجعياً، ويحتوي هذا الطور على كميات قليلة من الملوثات، لذلك يبخر الماء ما يؤدي إلى حصور حالة تشبع عالي للحمض ويؤدي إلى تبلوره. ترشح البلورات باستخدام مرشح مفرغ هوائياً. ويعاد بخار الماء الناتج من جهاز البلّورة إلى جهاز الإستخلاص بواسطة مضخة مفرغة، ومبادل حراري. في هذه العملية تستعمل عدة دورات: دورات المذيب العضوي من الإستخلاص الرجعي، والماء من دورات البلّورة الذي يدور رجوعاً إلى جهاز الاستخلاص. ويعاد ماء الغسل من المرشح الأخير إلى المبلور. يمكن كذلك أن يدوّر الماء من المرشح الأول إلى المخمر، ولكن هذا الشيء لا يطبق عادة بسبب إمكانية المخاطرة بتلوث المخمر.

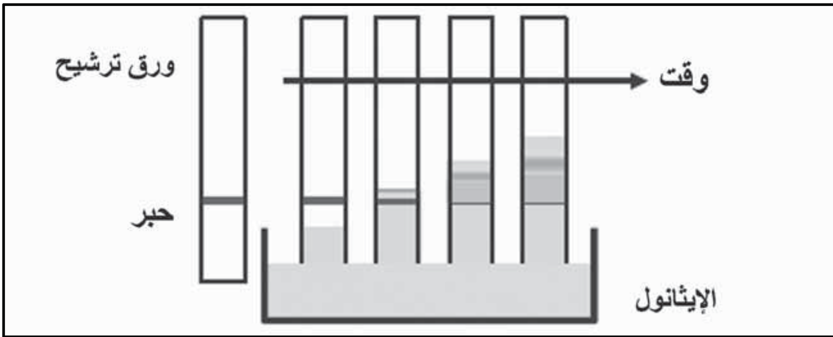
إن عمليات التدوير هذه مطلوبة لأسباب اقتصادية وبيئية. وإن الرقم الهيدروجيني للمحلول المائي هو الذي يتحكم بتوازن حمض الستريك. وفقط يمكن استخلاص الأنواع متعادلة الشحنة في الطور العضوي. إن تفاعل التعقيد (Complexing reaction) هو تفاعل باعث للحرارة (Exothermic)، وعند درجات الحرارة الأعلى يتحول تفاعل التوازن إلى اليسار، ويستخدم هذا المبدأ عادة خلال عمليات الاستخلاص والاستخلاص الرجعي. بالنسبة إلى الاستخلاص يمكن استخدام عدة أنوع من الأجهزة، وإن أبسط وأكثر الأجهزة استعمالاً هو جهاز الخلاط – المرسب (The mixer – settler) الذي يمكن اعتبار أدائه المزدوج هذا مرحلة واحدة.

6.9 التنقية الفائقة Ultrapurfication

إن العديد من المنتجات الصيدلانية، وخاصة تلك التي تحقن في جسم الإنسان عن طريق الوريد يجب أن تكون فائقة النقاوة، وإن الحاجة إلى نقاوة عالية جداً (بنسبة 99.999%) هي ليست بالمطلب الغريب. من الشائع في صناعة الدواء استخدام عمليات الامتزاز (Sorption processes) التي تستعمل طوراً صلباً مساعداً وإن فصل الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات ستعرض هنا لتوضيح عملية التنقية الفائقة. التجربة التالية هي مثال على عملية الفصل باستخدام مادة امتزاز صلبة (Solid sorbent): خذ شريطاً من ورقة ترشيح، وارسم خطاً على عرض الشريط بقلم حبر جاف. ضع قاعدة الشريط في الإيثانول، انظر الشكل (18.9). سيسري الإيثانول في الورقة باتجاه الأعلى بسبب القوى الشعرية (Capillary forces). عند وصول الإيثانول إلى الخط المرسوم يذيب الحبر وينقل مكوناته إلى الأعلى. وستتحرك المكونات اللونية المختلفة في الحبر الجاف بسرعات مختلفة، وتنفصل عن بعضها البعض الآخر. وبهذا فإن الخط المرسوم سيصبح واسعاً ومكوناً من عدة حزم ذات ألوان مختلفة. ينفصل الحبر الأزرق إلى حزمة أمامية بنفسجية اللون وحزمة خلفية زرقاء مخضرة اللون. إن هذا مثال نموذجي لعملية الفصل باستخدام الكروماتوغرافيا، وهي تتطلب:

- مغذياً (= الخط المرسوم بالحبر الجاف).
- مادة أساس مسامية (= ورقة الترشيح).
- مادة مستخلصة (Eluent) (= إيثانول).

تتكون المادة الأساس في عمليات التقنية الحيوية من خرزات كروية ذات قطار 10-100 مايكرومتر، موضوعة في عمود. تحوّل الخرزات إلى مادة هلامية تظهر على شكل ألياف جزيئية متشابكة تكوّن ثقوباً مملوءة بالماء يبلغ قطرها حوالى 10 نانومتر، وتكون من الكبر بحيث تكفي لمرور البروتينات. تتفاعل البروتينات المختلفة بشكل مختلف مع المادة الأساس. والبروتين الذي يتفاعل بقوة سوف يتخلف في حركته أكثر من البرويتن الذي لا يرتبط بالمادة الأساس. والصفات التي تسيطر على مثل هذا التفاعل هي:



الشكل 18.9: الكروماتوغرافيا البسيطة.

جميع الخصائص قد تلعب دوراً في عملية الفصل، ولكن عادة هناك خاصية واحدة تكون هي المهيمنة، وهي التي تحدد اسم عملية التمزّز أو الامتزاز (Sorption)، وهذه العمليات هي:

- الترشيح الهلامي (Gel filtration) (الفصل على أساس الحجم).
- الادمصاص (Adsorption) (تفاعل كاره الماء، الفصل على أساس القطبية).
- تبادل أيوني (Ion exchange) (الفصل على أساس الشحنة).

- كروماتوغرافيا الألفة Affinity chromatography) (الفصل على أساس الشكل: بعض الجزيئات تتلاءم تماماً مع السطح).

يعتمد التفاعل بين البروتين والمادة الأساس كذلك على البروتين وتركيزه، وعلى تركيز المكونات الأخرى في المحلول، وخصائص المذيب، والرقم الهيدروجيني وقيمة (I) للمذيب، وكذلك على درجة الحرارة (T). إن معامل الفصل لمكون ما بين المادة الأساس والمحلول هو متغاير مهم (مثل معامل الفصل في عملية استخلاص مائع – مائع). وهو موضح بالعلاقة التالية:

$$K = Q/C \qquad (31.9)$$

حيث تمثل Q تركيز البرويتن في الهلام و C التركيز في المذيب. تشير القيم المنخفضة لـــ K إلى أن البروتين ينفر (Repelled) من المادة الأساس، أما قيم K العالية فتشير إلى انجذاب البروتين إلى المادة الأساس. عند التراكيز العالية قد تصبح المادة الأساس مشبعة. وتكون مادة الوسط الممتز، إما:

- غير قابلة للذوبان،
- أو ذات ثقوب كبيرة،
- أو مستقرة ميكانيكياً،
- أو محبة للماء،
- أو ذات شكل مناسب،
- أو مستقرة من الناحية الكيموحيوية.

هناك أنواع عديدة من مواد التمزّز: البوليمرات العضوية، الكريات اللاعضوية (Inorganic pellets)، والمواد المركبة (مثل ممتزات الطور المعكوس Reversed – phase sorbents).

تستعمل الممتزات اللاعضوية في إزالة الألوان، وتتكون من كربون منشط أو سيليكا أو ألومينا (Alumina). أما البروليمرات العضوية فتستخدم في تنقية

الأحماض الأمينية والمضادات الحيوية والبروتينات، وهي تتكون من بولي ستايرين، أو من (Poly (methyl) acrylate)، أو سكريات متعددة (مثل الديكستران، أو الأجاروز...). هنالك طريقتان لاستعمال عمود الامتزاز:

(1) استعماله كعمود كروماتوغرافيا، (2) كنظام إدمصاص/تجديد (Adsorption/regeneration).

الكروماتوغرافيا Chromatography

في الكروماتوغرافيا الأولية هناك سريان مستمر للحال (Eluent) (مائع ملائم) خلال العمود. تحقن، وفي لحظة معينة، دفعة من المغذي (Feed) في مدخل العمود. قد تتكون هذه الدفعة من المكونات (أ) و (ب) حيث تكون (ب) أسرع حركة من (أ). بعد مرور زمن معين تجمع ذروات (Peraks) كلا المكونين كأجزاء منفصلة في خرج (Outlet) العمود. تعاني عملية الفصل اتساع الذروة (Peak broadening) التي يمكن تحسينها باستخدام عمود أطول أو باستخدام معدل حال (Elution) أبطأ. يمكن معالجة كمية محدودة فقط من المغذي بهذه الطريقة. يمكن زيادة الإنتاج عن طريق حقن حزمة من المغذي إلى داخل العمود. عند سرعة حل معينة ستكون هنالك حاجة إلى عمود أطول، ولكن، وكمعدل، فإن الاستخدام الأمثل لمادة العمود هو الأسلوب المفضل. وتعتمد الطريقة الأخرى على زيادة تركيز المغذي والدخول في مجال الكروماتوغرافيا غير الخطية (Non–Linear chromatography).

تكوّن الحزم ذرواتٍ أو قمماً مثلثية الشكل: ذات مقدمة حادة وذيل منتشر. في هذه المرّة أيضاً يتطلب زيادة طول العمود ولكن، كمعدل، فإن مادة العمود يتوجب استخدامها بكفاءة أعلى. إن التدرج في تركيب المغذي (المستخلص) يمكن أن يستخدم أيضاً باستعمال تغايرات في الرقم الهيدروجيني أو (I) أو قطبية المذيب.

الادمصاص/التجديد Adsorption/ regeneration

يمكن الحصول على أكبر طاقة إنتاجية لوحدة حجم العمود باستعمال طريقة الادمصاص/ التجديد، وهي عملية متعددة الخطوات. يمكن استعمال هذه التقنية

عندما يكون المنتوج المرغوب (أ) قادراً على الارتباط بالمادة الأساس بشكل أفضل من ارتباط المادة الملوثة (ب).

يدفع المغذي خلال المهد أثناء عملية الادمصاص. وستعمل الخرزات الجديدة على ادمصاص الجزء (أ) بشكل رئيسي لحين تشبع السطح وإزالة الكمية الصغيرة الممدصة من (ب) خلال عملية الغسل. يعاد تجديد العمود باستخدام مادة حالّة (Eluent) ذات خصائص مختلفة تعمل على إزالة المكوّن الممدص من المادة الأساس، بعدها تعاد الدورة مرة أخرى. الجهات الأمامية للمواد الممدصة تكون حادة عادة، ويمكن الحصول على فصل جيد، خلال عملية التجديد فإن الذيول المنتشرة تجعل عملية الفصل أكثر صعوبة.

الترشيح الهلامي Gel filtration

تنفصل الجزيئات خلال الترشيح الهلامي على أساس اختلافها في الحجم. يحتوي الهلام على مدى معين من حجم الثقوب (Pore size distribution). وبهذا فإن الجزئيات الصغيرة تتمكن من النفاذ خلال ثقوب الهلام، في حين لا تتمكن الجزيئات الكبيرة من ذلك. وعليه فإن الجزيئات الصغيرة تتحرك بسرعة أكبر. يتم تقليل الادمصاص على سطح الهلام إلى الحد الأدنى: عندما تذوب جزيئات البروتين في الماء الموجود في الثقوب. لحبيبات الهلام تركيب مفتوح جداً وهي قابلة للانضغاط: إن هذا يحدد من الطول المسموح به للعمود، ومن السرعات. إن القيم النموذجية للمنظومة هي: قطر الحبيبة d_p=0.1 – 0.2 mm، طول العمود L=0.3 - 1mm، دفق المائع ø= 2-5 x 10^{-5} m/s وتوزان الفصل.

توازن الفصل Partition equilibrium

يتكون الهلام في الشكل 19.9 من آلياف ذات سمك (F). المسافة الموجودة بين الألياف يمثلها ε. إن مركز البروتين الكروي لا يتمكن من الوصول إلى الليف بمسافة أقصر من نصف قطر البروتين. وعليه فإن جزء المائع ذا اللون الفاتح في الهلام هو فقط الذي ستشغله البروتينات. أما بالنسبة إلى البروتينات الأكبر فإن

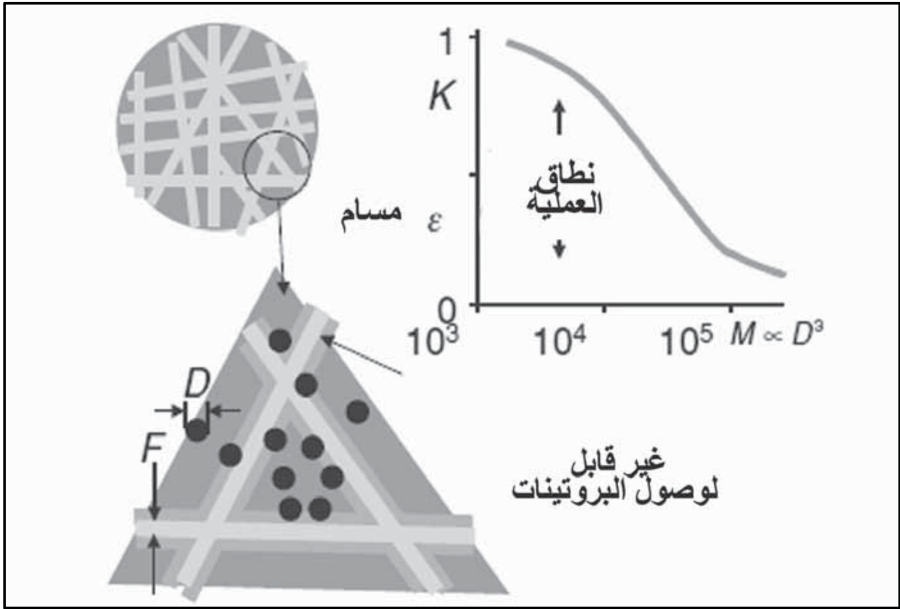
المساحة المتاحة لها تكون أقل، وبالنسبة إلى البروتينات ذات القطر (D) فإن الحجم المتوفر هو:

$$m = \exp[-(1-\varepsilon)(1+D/F)^2] \qquad (32.9)$$

وبما أن الادمصاص على جدار الثقب يكون معدوماً، فإن هذا يساوي معامل الفصل. يكون معامل الفصل أقل من واحد، وهذا يشير إلى وجود بروتين أقل في الهلام مقارنة بوجوده في المائع المحيط، وهذا ليس له علاقة تذكر بتركيز البروتين.

جميع الجزيئات الصغيرة لها نفس زمن الاحتفاظ أو المكوث (Retention time)، وكذا الحال بالنسبة إلى الجزيئات الكبيرة، ويكون الهلام فعالاً فقط في فصل الجزيئات التي لها نفس قطر الألياف تقريباً. يغطي مدى الأقطار هذا كتلاً مولارية تختلف بعامل يصل إلى 20 مرة. ويسمى الهلام عادة على أساس التكلة المولارية القصوى التي يمكنه الاحتفاظ بها. فعلى سبيل المثال Sephadex TM G100 يمكن استعماله إلى قيمة كتل مولارية تصل إلى 100 kg/m.

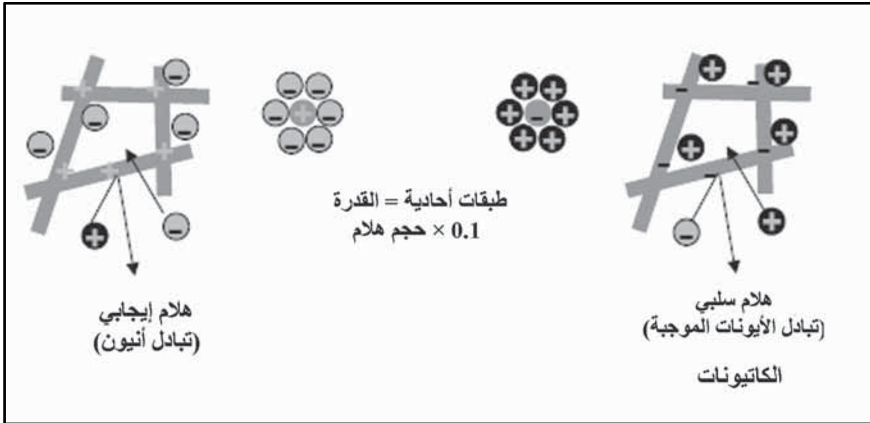
في عملية الامتزاز هذه تحتوي المادة الأساس الصلبة على مجاميع مشحونة. ويمكن لهذه المجاميع أن تكون موجبة أو سالبة الشحنة. فالمبادلات الإيجابية الشحنة هي رباعية الأمونيوم (Quaternary ammonium) في حين تتكون المبادلات السالبة الشحنة من حمض السلفونيك (Sulfonic acid). إن الأيونات ذات الشحنة المشابهة لشحنة المادة الأساس تتنافر، وإن كمية الأيونات الحرة المعاكسة والشحنات المرتبطة بالمادة الأساس تكون متشابهة. يمكن أن تكون الأيونات المعاكسة أيونات صغيرة، ولكن يمكن أن تكون جزيئات كبيرة أيضاً مثل البروتينات. ويمكن للأيونات المعاكسة (Counter Ions) أن تتبادل مع الأيونات المعاكسة الأخرى في المحلول. إن المادة الأساس الموجبة تتبادل مع الأيونات السالبة والعكس بالعكس، وإن الهلام المستخدم في التبادل الأيوني يكون مفتوحاً أكثر من هلام الترشيح: كما أن البروتينات لا تنفصل على أساس الحجم. ويمكن للبروتينات أن تكون طبقة واحدة حول الألياف في المادة الأساس (انظر شكل 9-20) ويمكن أن تشغل إلى حد 10% من حجم الهلام. إن معامل الفصل في المبادل الأيوني يمكن أن يكون أكبر كثيراً من واحد.



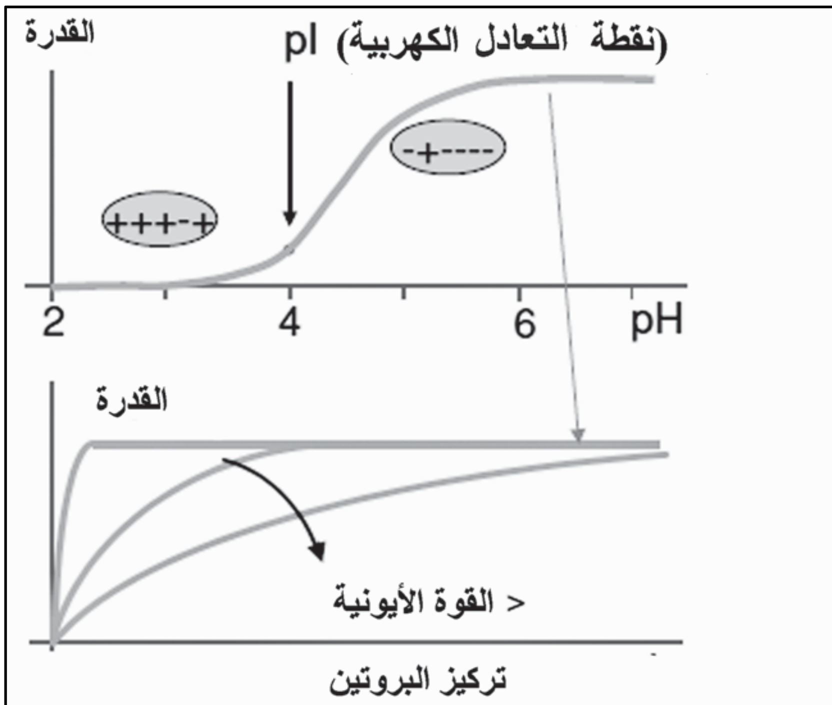
الشكل 19.9: فصل البروتينات خلال الترشيح الهلامي.

قد يكون للبروتينات شحنات موجبة أو سالبة اعتماداً على الرقم الهيدروجيني للمحلول (انظر الجزء 4.9). عندما تكون القيمة أقل من قيمة نقطة التعادل الكهربائي للبروتين (pI) فإن الشحنة الصافية للبروتين تكون موجبة، ولكن هذا يتغير عندما تزيد قيمة pH على نقطة التعادل الكهربائي (pI). إن السعة القصوى لمبادل أيوني سالب (Anion) لبعض البروتينات موضحة بالشكل (21.9). تحت نقطة التعادل الكهربائي (Isoelectric point) يكون البروتين موجب الشحنة ويتنافر. ولكن فوق هذه النقطة يصبح البروتين سالب الشحنة، وبهذا فإنه يجذب.

تزداد السعة إلى أقصى قيمة. ويمكن الوصول إلى السعة القصوى عندما تكون القوة الأيونية منخفضة في المائع الذي يحيط بالحبيبات. عند القوة الأيونية العالية تقوم الأيونات الصغيرة بطرد البروتينات. إن منحنى السعة للمبادل الأيوني الموجب الشحنة هو في الحقيقة صورة مرآة للمبادل السالب الشحنة. في هذه الحالة فإن البروتينات موجبة الشحنة (أقل من قيمة نقطة التعادل الكهربائي الخاصة بها) ترتبط بشكل جيد.



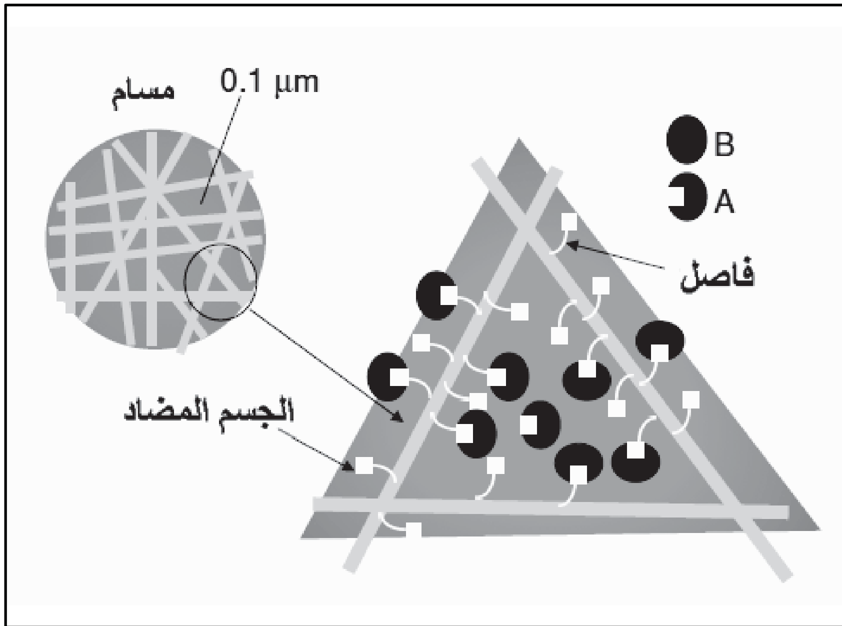
الشكل 20.9: التبادل الأيوني.



الشكل 21.9: سعة مبادل أيوني سالب الشحنة.

للبروتينات خصائص شكلية تسمح لها بالتلاؤم التام مع جزيئات معاكسة تدعى الأجسام المضادة (Antibodies) أو الروابط (ligands). إن مادة مدمصة مع جسم مضاد على سطح الثقب يمكن لها أن ترتبط، وبخصوصية، مع جزيئة

واحدة معينة. وهذا هو ما يسمى بادمصاص الألفة. إن لمادة الادمصاص ثقوباً تكون أكبر حتى من ثقوب هلام المبادل الأيوني، وذلك لأن عليها أن تحتوي الأجسام المضادة إلى جانب البروتينات. وعليه، يتطلب توفر مساحة كافية للجسم المضاد لكي يتمكن من وضع نفسه بحرية نسبة إلى البروتين. ترتبط الأجسام المضادة بجدار الثقب عن طريق فاصلات (Spacers) (الشكل 22.9). ويشبه هلام المادة الأساس ذلك الذي يستعمل في الترشيح الهلامي. لذلك، يجب اختبار الفاصل بعناية بحيث يسمح بأقل تفاعل ممكن مع مكونات المغذي. يعتبر ادمصاص الألفة طريقة جذابة لفصل مكونات معينة. هذا وتستخدم مادة العمود كلياً ويكون المنتوج نقيّاً ومُركّزاً، ولا تحتاج العملية إلا إلى كمية قليلة فقط من المستخلص الحال (Eluent). علماً بأن هذه الطريقة تعاني بعض المشاكل، حيث إن كل مكوّن يحتاج إلى تطوير جسم مضاد خاص به، كما إن مادة الادمصاص غالية الثمن، وغالباً ما تكون غير مستقرة كيميائياً. كما إن الفواصل يمكن أن تنفصل (Detach) مما يؤدي إلى فقدان في درجة الكفاءة.

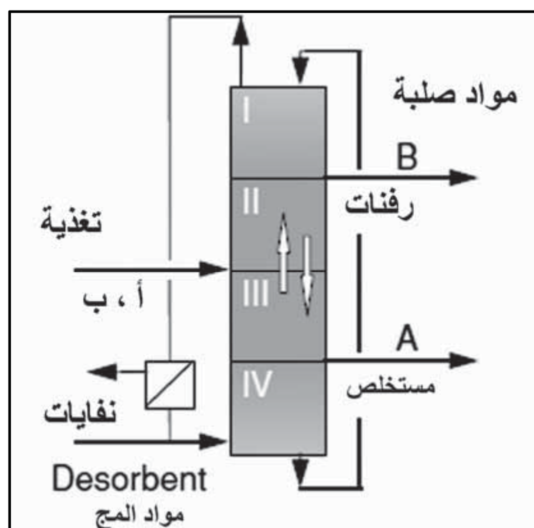


الشكل 22.9: تركيب مادة ادمصاص الألفة.

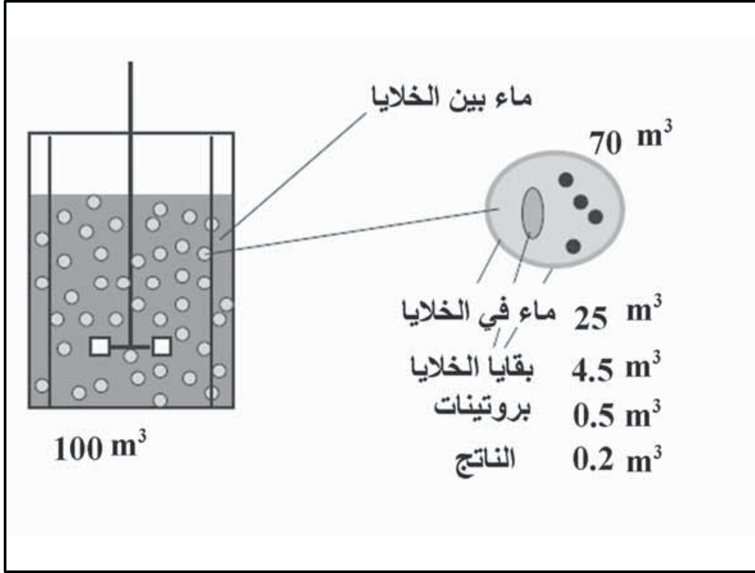
إبداعات في مجال الكروماتوغرافيا Innovations in chromatography

هناك جهود مستمرة نحو تحسين عملية الكروماتوغرافيا، كان أولها في تطوير أطوار مستقرة جديدة، تظهر قوة ميكانيكية، وسعة، وانتقائية (كروماتوغرافيا ألفة) أفضل. يمكن للكروماتوغرافيا أن تستخدم مائعاً كطور مستقر، على سبيل المثال، في كروماتوغرافيا الفصل بالنبذ المركزي (Centrifugal partitioning chromatography). تستخدم هذه التقنيات بشكل واسع في الصين لاستخلاص المنتوجات الطبيعية في الطب.

التطور الآخر هو "المهود المتحركة الحفازة" (Stimulated moving beds) التي تستخدم بشكل واسع في الصناعات الغذائية، والصيدلانية، والكيميائية الدقيقة. توفر هذه الطريقة استخدام كفوء للمذيبات وللطور المستقر من خلال تشغيل الفصل الكروماتوغرافي بشكل مستمر (مقارنة بطريقة الدفعة التي تستخدم اعتيادياً)، انظر الشكل (23.9). تحفز الحركة المستمرة للطور الصلب بواسطة تغيير المنافذ (Ports) والمغذي، والمستخلص والنتاج المنقى بالإذابة (Raffinate) في صينية (Carrousel) من المهود الثابتة. إن القوة الدافعة للنقل الكتلي في فعل التيار المعاكس المستمر تكون أعلى، وبهذا فإن الأجهزة تستغل مكونات العمود بشكل أفضل.



الشكل 23.9: كروماتوغرافيا المهود المتحركة المحفزة.



الشكل 24.9: محتويات المخمر.

7.9 تحديد التتابعات Sequencing

لأجل تطوير عملية جيدة، علينا جعل كل القطع المكونة للجهاز تعمل مع بعضها بعضاً. ولتوضيح هذه المشكلة سنتطرق إلى عملية تبدو سهلة في المختبر، ولكنها تحتاج إلى تضخيم. المثال هو معالجات أسفل المجري (Downstream) لأنزيم خلوي (Intracellular enzyme). وتم اختيار سعة تخميرية كبيرة لأنها ستوضح، في الحقيقة، المشكلة في معالجات أسفل المجرى. يتكون مرق المخمر (الشكل 24.9) بشكل رئيسي من الماء. وتوجد كمية قليلة فقط من المنتوج إضافة إلى خليط معقد من مكونات النواتج الأيضية الثانوية ذات الأحجام والأشكال المختلفة. ولأجل التبسيط سنأخذ بعين الاعتبار المكونات التالية فقط:

- ماء مع أملاح ومواد مغذية أخرى،
- أربعة أنزيمات مختلفة،
- بقايا حطام الخلايا.

للأنزيمات الأربعة أحجام ونقاط تعادل كهربائي مختلفة، انظر الشكل (25.9). الأنزيم رقم 3 هو المنتوج المرغوب فيه وعلينا تنقيته. يقترح الشكل (25.9) عملية فصل على أساس الكبر باستخدام الترشيح الهلامي، يعقبها عملية فصل على أساس الشحنة باستخدام التبادل الأيوني. يمكن إجراء هذا الشيء في المختبر وببساطة.

(0)	$95 m^3$			<1 مع ماء
(1)	$0.1\ m^3$	pI = 4	3 نانومتر	1 انزيم
(2)	$0.1\ m^3$	5	5 نانومتر	2 انزيم
(3)	$0.2\ m^3$	4	5 نانومتر	3 انزيم
(4)	$0.1\ m^3$	6	7 نانومتر	4 انزيم
(5)	$4.5\ m^3$		نانومتر 100 بقايا الخلايا	

الشكل 25.9: خصائص المكونات الستة في المخمر.

يتم اختيار منتوج صناعي (بمقدار 200 طن سنوياً) مما يعني الحاجة إلى مغذٍ للتخمير بمقدار $100\ m^3/hr$. تبدأ العملية بخلخلة الخلايا وتحطيمها باستخدام مجانس (Homogeniser) لأننا نتعامل مع منتوج داخل خلوي (Intracellular). هناك حاجة إلى صمام صغير، وهنا تكمن الكلفة في استهلاك الطاقة المستخدمة للتبريد والخلخلة (يفترض أن تكون 3MW). تجري عملية التصفية بواسطة الترشيح. وبما أن بقايا الحطام صغيرة للغاية فإن عملية الترشيح تتطلب زمناً طويلاً. ويمكن تسريع الترشيح بإضافة عامل مساعد (Filter aid).

يتكون العامل المساعد للمرشح من حبيبات كبيرة تجعل كعكة المرشح أكثر مسامية، وبهذا ستزيد من الدفق. هناك حاجة إلى خطوة غسل شاملة لمنع فقدان المنتوج مع كعكة المرشح. ويمكن استخدام مرشح الأسطوانة الدوارّة المفُرّغة مع مساحة ترشيح كبيرة.

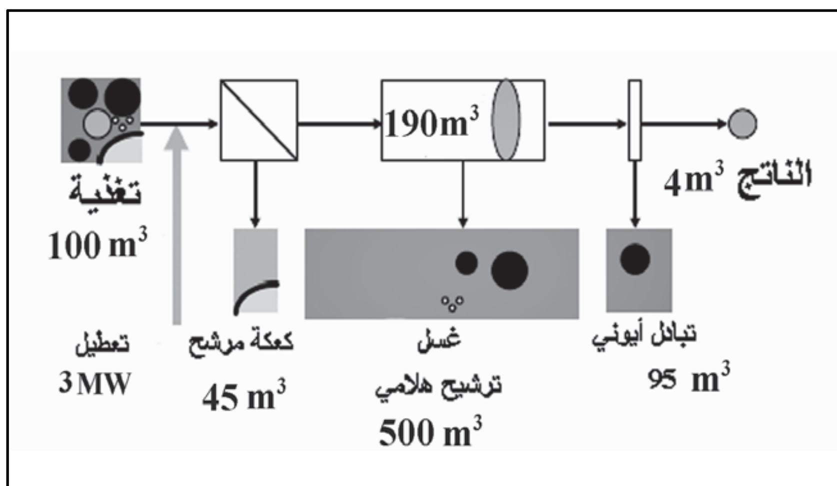
إن المشكلة الرئيسية تتحدد في عامل المرشح المساعدة لأنه ينتج كميات هائلة من الفضلات الصلبة التي يصعب بيعها، أو معالجتها، أو إتلافها. إن أهم الخطوات في عملية تنقية الأنزيم هي الترشيح الهلامي، والتبادل الأيوني. يعتمد الترشيح الهلامي على الاختلاف في الحجم المطلوب. وإن جزءاً وسطياً يحتوي على الأنزيمين 2 و 3 مطلوب في أكثر عمليات الفصل صعوبة، وهو فصل الأنزيمين 2 و 3 عن الأنزيم 4. وهذه المشكلة، هي التي تحدد طول العمود المطلوب، وكمية الماء المستخدمة في الغسل. أثناء عملية الترشيح الهلامي النموذجية ليس هناك تخفيف أو تركيز. فإن كل جزء يترك العمود يكون بحجم مساوٍ لحجم المادة المغذية. وهذا يعني أخذ حجم يبلغ ثلاثة أضعاف الحجم المغذي. ولأجل أخذ الخسارة بالحسبان يؤخذ عادة حجماً بِقَدر خمسة أضعاف حجم المغذي. وتتم خلال عملية تضخيم الترشيح الهلامي المحافظة على العوامل التالية بشكل ثابت:

- تركيب المغذي،
- حبيبات الهلام المستخدمة وحجومها المنتقاة،
- سرعة المائع.

يقود هذا إلى تكوين تراكيب واسعة ومفلطحة شبيهة بكعكة المقلاة (Pankake) التي قد يصبح التوزيع السيّئ للسائل فيها مشكلة. تحتاج العملية إلى مهد تبلغ مساحة سطحه $190\ m^2$ خلال خطوة التبادل الأيوني، وهناك حاجة إلى فصل الأنزيمين 2 و 3 فقط. ويمكن إجراء ذلك باستخدام مبادل أيوني سالب برقم هيدروجيني يساوي 5. في هذه الحالة سيرتبط الأنزيم 3 بقوة في حين يكون ارتباط الأنزيم 2 ضعيفاً. وتجري عملية التجديد (Regeneration) بخفض قيمة الرقم

الهيدروجيني إلى 4. بالنسبة إلى الأنزيم 3، يختار كمية من المستخلص الحال (Eluent) تبلغ ثلاث مرات السعة المختارة للأنزيم، التي يجب أن تكون كافية.

لراتنجات (Resins) التبادل الأيوني سعة أكبر من راتنجات الترشيح الهلامي، وهذا هو سبب احتياجنا إلى أحجام راتنجات تبادل ايوني أصغر. ويفترض أن يتضاعف تركيز الأنزيم عشر مرات. والنتائج موضحة بالشكل (26.9).



الشكل 26.9: الأحجام والمساحة والطاقة المطلوبة في العملية.

لتلخيص العملية : يتم الحصول على $0.2\ m^3$ من المنتوج النقي في محلول يبلغ حجمة $4m^3$.

والفضلات المنتجة هي:

- $54\ m^3$ من كعكعة المرشح،
- $500\ m^3$ فضلات ماء من الترشيح الهلامي،
- و $95\ m^3$ ماء من التبادل الأيوني.

يبلغ حجم الفضلات 3000 مرة حجم المنتوج (عامل $E = 3000$)! هناك حاجة إلى كميات هائلة من الهلام، إضافة إلى دخل طاقة تبلغ 3MW.

يمكن إجراء التحسينات التالية:

يمكن تقليل كمية المائع المستعمل في الترشيح الهلامي من خلال خطوة ترشيح فائق.

ويمكن إزالة تسعة أعشار المائع بهذه الطريقة. إن هذا يؤدي إلى اختزال حجم عمود الترشيح الهلامي بمقدار عشر مرات، مع اختزال كميات فضلات الماء. التحسين الآخر الواضح هو تغيير ترتيب الترشيح الهلامي والتبادل الأيوني. فقد تصبح عملية التبادل الأيوني أكثر تعقيداً في هذه الحالة، ولكننا سنحتاج إلى إزالة أنزيمين فقط من عمود الهلام. وسيؤدي هذا إلى اختزال كميات الفضلات المائعة بصورة أكبر. في حالة استخدام كائنات مجهرية قادرة على إنتاج الأنزيم بتركيز عالٍ، سيتم اختزال كبير في حجم الفضلات. هذا وتمثل كعكة المرشح مشكلة. وإن أحد الاحتمالات الممكنة هو في ادمصاص المكون المرغوب مباشرة من مرق التخمير، وبهذا تجنب خطوة الترشيح. ويمكن إرسال فضلات المرق إلى المعالجة الحيوية.

لا يمكن إجراء الادمصاص في العمود بسبب مشاكل الانسداد. ولكن يمكن إجراؤه في مفاعل حيوي يستخدم مواد ادمصاص طينية القوام (Slurry adsorbent). إن مائع التخمير هو الذي يحدد ظروف الادمصاص، وربما لا يكون مثالياً لعملية فصل المنتوج. سيتم ادمصاص خليط من المكونات. علماً، أن هذه الطريقة قد تؤدي إلى اختزال هام في نواتج معالجات أسفل المجرى عن طريق التركيز المبكر في العملية.

أجريت بعض البحوث الصناعية في هذا المجال، إلا أن قليلاً من العمليات فقط تتبع هذا الطريق عملياً. ويكمن السبب في ذلك في تسميم (Poisoning) أو ترسيب مادة الادمصاص بوساطة المكونات الأخرى لخليط التفاعل.

يمكن لحطام الخلايا أن تتشابك مع بعضها بعضاً، مما يؤدي إلى زيادة قطر حبيبة الحطام مما يجعل الترشيح ممكناً حتى بدون الحاجة إلى مساعد مرشح. طبعاً ستختفي مشكلة الترشيح بالنسبة إلى الكائنات المجهرية الكبيرة والتي يمكنها

إنتاج أنزيمات خارج خلوية. والمشكلة المرتبطة بهذه الطريقة هي التحلل المحتمل للأنزيم عند السطح البيني بين الغاز والمائع في المخمرة.

الاستنتاج من هذا التمرين يجب أن يكون الآتي:

- إن تضخيم الوصفات المختبرية قد لا يقود إلى عملية صناعية جيدة،
- يجب الأخذ بعين الاعتبار وبعناية موضوع الفضلات الناتجة،
- يجب إجراء اختزال الحجم في مرحلة مبكرة من العملية،
- وتجنب الإنتاج الداخل خلوي (Intracellular) ومساعدات المرشح (إن أمكن ذلك)

8.9 قراءات إضافية Further reading

Garcia, A., M. R. Bonen, J. Rmairez-Vick, M. Sadaka and A. Vuppu. *Bioseparution Process Science*. Massachusetts: Blackwell, 1999.

Harrison, R. C. *Protein Purification Process Engineering*. New York: Marcel Dekker, 1994.

Olson, W. P. *Separations Technology: Pharmaceutical and Biotechnical Applications*. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1995.

Schügerl, K. *Solvent Extraction in Biotechnology: Recovery of Primary and Secondary Metabolites*. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

Seader, J. D. and E. J. Henley. *Separation Process Principles*. New York: John Wiley and Sons, 1998.

Thornton, J. D. *Science and Practice of Liquid--Liquid Extraction*, Vol. 1. Oxford: Clarendon Press, 1992.

Answer to assignments أجوبة الفروض

9.1: 6,2,1<1

9.2: 1.59 m^3 h^{-1}, 3, 20%

9.3: 8.82 x 10^{11} mkg^{-1}, 8.78 x m^{-1}, 22.14 m^3h^{-1}

9.4: 0.12 kg s^{-1}, 1.2 m^2

9.5: 5.59 x 10^{-6} m s^{-1}, 12 mmol 1^{-1}

الفصل العاشر

القياس والمراقبة والنمذجة والسيطرة

Measurement, Monitoring, Modeling and Control

Bernhard Sonnleitner **برنارد سونلايتنر**

Zürich University of Applied Sciences, Switzer land **جامعة زيوريخ للعلوم التطبيقية، سويسرا**

1.10 المقدمة Introduction

إن النشاطات الخلوية مثل نشاط الأنزيمات أو الأحماض النووية هي التي تحدد أداء العمليات الحيوية. ولكن لسوء الحظ يصعب أو حتى يستحيل قياس هذه النشاطات. وبالتالي فعلينا مراقبة أو تقدير متغايرات معينة مثل كثافة الكتلة الحيوية، أو المواد الأيضية، أو المواد الأولية، أو النواتج، أو الجزيئات المنظمة. وغالباً ما تستطيع هذه المتغايرات التابعة إيضاح أهداف العملية بشكل مباشر تقريباً. وإذا لم نتمكن من ذلك، فعلينا إعداد صيغ أو نماذج (Models) ونستغلها في تقدير المتغايرات التي يمكن قياسها أو مراقبتها بأهداف العملية المرغوبة. علينا كذلك، معرفة كل المتغايرات التشغيلية ذات العلاقة التي تؤثر في الأهداف المرغوبة بشكل فعال، كما ونحتاج كذلك إلى معرفة كيفية تأثير هذه المتغايرات في هذه الأهداف.

2.10 المصطلحات Terminology

القياس (Measuring): ويعني وصف المتغاير نوعياً و/ أو كمياً. يمكن أن يكون المتغاير شيئاً فيزيائياً، ويكون هذا سهل القياس عادة، أو قد يكون كيميائياً أو حيوياً، وعندها يصعب القياس. تعتمد عملية القياس على استخدام طرق تحليلية

وأجهزة. وتقاس المتغايرات المرغوبة عادة باستخدام طرق قياس غير مباشرة. فعلى سبيل المثال، لقياس تركيز الجلوكوز، نقوم بتحويل حجم معلوم (Known aliquot) من β-D.Glucose بوجود الأوكسجين (المذاب) وباستخدام أنزيم Glucose oxidase إلى Gluconolactone و H_2O_2 الذي يؤكسد لاحقاً باستخدام قطب قياس أمبيري (Amperometric electrode). يكون القياس النهائي عبارة عن جهد تيار كهربائي يمكننا أن نقرنه بتركيز الجلوكوز باستخدام صيغ الرياضيات الكيميائية (Stoichiometry)، أو الصيغ والنماذج الحركية (Kinetic models).

المراقبة (Montioring): تعني الحصول على معلومات عن العملية من دون الحاجة إلى التدخل اليدوي أو الشخصي، ومن دون الإخلال بالعملية. تشمل المراقبة بعض الحالات التي يتطلب فيها سحب نماذج من العملية.

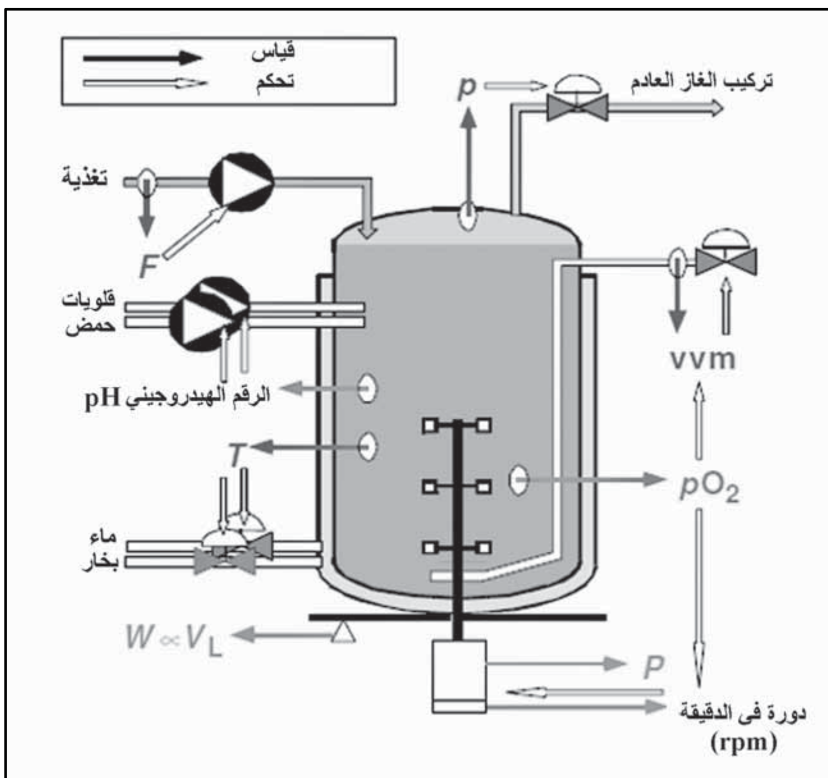
التصييغ أو النمذجة (Modelling): وهو وصف عام غير دقيق لعلاقة واحدة أو أكثر بين سبب واحد أو أكثر، وتأثير واحد أو أكثر. نحتاج هنا إلى معايرة هذه الصيغ أو النماذج لكي نجعلها مفيدة. ويتم ذلك من خلال التقويم أو المعايرة (Calibration) أو بواسطة التدريب، أي نتظاهر بمعرفتنا الدقيقة للأسباب والتأثيرات. وعملياً، نحن نستغل الصيغ في الغالب بشكل معكوس. نحن نقيس أو نراقب التأثيرات، ثم نتبعها رجوعاً إلى مسبباتها. في هذه الحالة، يجب التحقق من هذه الصيغ بواسطة مجاميع من النتائج التي تكون مختلفة ومستقلة عن التقويم أو التدريب على الأجهزة. حسب هذا السياق، فإن النمذجة أو التصييغ هي ببساطة أداة وليس هدفاً بحد ذاته.

السيطرة (Control): تعني أخذ المعلومات المستحصلة من العملية، ومعالجتها رياضياً، ثم استخدامها على نفس العملية لأجل الحفاظ على واحد أو أكثر من المتغايرات المقاسة أقرب ما يمكن للنقاط الموضوعة مسبقاً. لا تحتاج هذه النقاط الموضوعة بحد ذاتها، أن تكون ثابتة بالضرورة، فهي قد تعتمد على الوقت و/أو متغايرات أخرى.

يستعمل العديد من المصطلحات التقنية بشكل متضارب في الأدبيات العلمية. والمصطلحات ذات العلاقة المستخدمة هنا لها المعاني التالية. *On-line* يعني أوتوماتيكي بالكامل، وهو على نقيض *Off-line* الذي يعني التعامل اليدوي بواسطة الأشخاص. *In situ* تعني في داخل المفاعل حصرياً، أو في داخل فتحة الدخول أو الخروج. *By-pass* تعبير يستخدم لأي فعل يحدث خارج المفاعل على نموذج مأخوذ من المفاعل؛ تدعى هذه العملية كذلك أحياناً *At-line*. قد يعاد النموذج المعالج مرةً أخرى إلى المفاعل أو يتم التخلص منه. أما *Off-line* فيعني أي فعل بعد أخذ النموذج ونقله إلى مكان آخر، إلى المختبر التحليلي مثلاً. توليد الإشارة المستمرة Continuous signal هو عكس الإشارة غير المستمرة. تولد إشارة الوقت الحقيقي (Real-time signal) آنياً أو بعد تأخر غير محسوس مقارنة بديناميكية العملية، وهي ملائمة بشكل جيد لأغراض السيطرة، في حين أن الإشارة المتأخرة مع أو بدون الوقت الميت، قد تكون أقل أو عديمة الفائدة للسيطرة على العملية. العديد من الطرق التحليلية المستخدمة لا تؤثر في العملية بتاتاً ولا على النماذج المأخوذة. توصف مثل هذه الطرق بكونها غير تداخلية أو مؤذية (Non-invasive) في حين هناك طرق أخرى تؤثر بشكل كبير في النموذج، فيتوجب التخلص منه بعد تحليله.

يجب أن تكون جميع المتحسسات المستخدمة في العمليات الحيوية الهندسية قابلة للتعقيم أو يجب أن تعمل خارج حاجز معقم آمن، وترتبط بالعملية الحيوية بواسطة وصلات ملائمة. يوفر هذا الأمر حماية للعملية من التلوث، وكذلك هو مهم للأمن الحيوي (Biosecurity).

يجب أن تكون المتحسسات ثابتة وموثوقاً منها لمدة أيام، أو حتى أسابيع، ويجب أن تكون ذات متطلبات صيانة قليلة لكي يمكن استخدامها في العمليات الصناعية.



الشكل 1.10: متغايرات العملية الحيوية التي تعتبر عموماً كمعايير: F = معدل التغذية (الحجمي أو الجذبي)، *p*= الضغط، pH = قيمة pH للسائل، pO_2= الضغط الجزئي للأكسجين الذائب، *P* = القوة الكهربائية المسحوبة بواسطة محركة الخفاق، rpm= سرعة محرك الخفاق (دورة في دقيقة)، T= درجة حرارة السائل، vvm= معدل التهوية (حجم الغاز/حجم السائل/دقيقة)، V_L = حجم السائل، W= وزن المفاعل. يشار إلى القياس (أو المراقبة) بأسهم صلبة، يشار لعمليات السيطرة بواسطة أسهم تؤشر نحو المشغل الآلي المعني (صمامات، مضخات، محرك).

3.10 القياسات التي تقبل عموماً كمعايير

Measurements generally accepted as standard

هنالك القليل من القياسات المقبولة عموماً كمعايير. وهي انعكاس بشكل رئيسي للمتغايرات الفيزيائية أو الكيميائية وليس الحيوية (الشكل 1.10). يمكن تحديد معظم المتغايرات الفيزيائية أوتوماتيكياً *On Line* ، أو، وهي في موضعها الأصلي *(In situ)* أو بشكل مستمر، وفي الوقت الحقيقي. أما المتغايرات الحيوية

فهي، مع بعض الاستثناءات، تحدد بعد أخذ النماذج وبشكل غير مستمر، وغالباً ما تشمل عملاً يدوياً وكثيراً من التأخير في الوقت.

1.3.10 تركيز الكتلة الحيوية: المتغاير الرئيسي

Bimass concentration: The key variable

إن تركيز الكتلة الحيوية هو مقياس بسيط للكمية المتاحة من الحفاز الحيوي (Biocatalyst). وإن القياس المثالي لحفاز حيوي في نظام تفاعل حيوي معين لا يتمثل بكتلته فقط ولكن أيضاً فعاليته أو حالته الفيزيولوجية أو شكله، أو مواصفات أخرى. وبما أن تحديد هذه الأشياء موضوعياً هو عملية صعبة، فإن تركيز الكتلة الحيوية يبقى المتغاير الرئيسي لأنه يوفر معلومات عن معدلات النمو و/أو تكوين المنتوج. إن جميع الصيغ الرياضية، تقريباً، المستخدمة لوصف النمو أو تكوين المنتوج تحتوي على الكتلة الحيوية كمتغير مهم. كما يهدف العديد من استراتيجيات السيطرة إلى زيادة تركيز الكتلة الحيوية إلى الحد الأقصى، وسنناقش لاحقاً فيما إذا كان ذلك صحيحاً.

المعيار الذهبي لتحديد تركيز الكتلة الخلوية هو طريقة يدوية، يعني حصد كمية معلومة من معلق المزرعة وفصل الخلايا بواسطة النبذ المركزي أو الترشيح، ثم غسل الخلايا وتجفيفها، لكي توزن بشكل ثابت على درجة حرارة تبلغ بضعة درجات فوق درجة غليان السائل المستعمل في العملية، وذلك لتجاوز حالة التكثيف الشعيري للسائل في عجينة الخلايا (تستخدم عادة 105 ˚C تحت ضغط جوي للأوساط المائية، ويمكن استخدام حرارة أقل في الظروف المفرغة من الهواء فقط). بعد تحديد وزن الكتلة الجافة في الأنبوب أو على ورقة الترشيح، يمكن حساب التركيز الكتلي في النموذج الأصلي، إذا لم تكن هناك مكونات حبيبية في الوسط الزرعي أو ترسبات تكونت خلال عملية الزرع. يمكن الحصول على النتيجة بعد مرور وقت طويل. يمكن تسريع عملية التجفيف باستخدام شحنات في الأشعة تحت الحمراء أو أفران الموجات المايكروية (Microwave ovens)، ولكن هذا يتطلب تطبيق طرق عمل قياسية صعبة، إلا أنه في الوقت عينه يختزل من الوقت اللازم لإجراء العملية ولأقل من 30 دقيقة.

توجد طرق بديلة أخرى مثل إيجاد علاقة بين مستوى الكتلة الحيوية والعدد الكلي للخلايا أو عدد الخلايا الحية. تحتاج هذه الطريقة إلى جهد كبير وهي عرضة للخطأ. يمكن أن تكون الأجهزة الحديثة لتحليل الصور مفيدة جداً (بالرغم من غلاء سعرها) في العد المجهري، حيث يمكن معرفة عدد الخلايا في وقت قصير. يجب الإشارة إلى أن القيم المقاسة لتراكيز كتلة الخلايا لا تتكافأ مع عددها تحت ظروف الحالة غير المستقرة. وإن ما يسمى خلايا قياسية هي خلايا ذات كتلة خلوية مفردة وتركيب ثابتين، ولكن مثل هذه الحالة هي الاستثناء وليس القاعدة.

تستخدم الكثافة الضوئية (Optical density) (OD) لمعلق خلوي بشكل واسع بدلاً من المعيار الذهبي. تحتاج هذه العملية إلى أخذ نماذج وعمل تخافيف مناسبة للمعلق باستخدام دارئ مناسب، ومن ثم تحديد شدة العكورة (Turbidity) المتسببة عن الخلايا المعلقة باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) وبطول موجي حوالى 600 نانومتر. تعكس قيم الكثافة الضوئية الامتصاص، والانعكاس، والتبعثر أو الاستطارة الأمامية للضوء، وبهذا فهي تعتمد على الحجم والشكل وتجمعات الخلايا، وتعتمد كذلك على وجود المواد المذابة والحبيبات من غير الخلايا الحية في المعلق. عند وجود نظام نموذجي، مصدّق لكل نظام حيوي مفرد، فإن هذه التقنية تعطي تقديراً مفيداً جداً وسريعاً لتركيز الكتلة الحيوية.

2.3.10 المتغايرات الفيزيائية والفيزيوكيميائية

Physical and physico – chemical variable

جميع المفاعلات الحيوي، تقريباً، توفر معلومات حول درجة الحرارة والضغط وسرعة الخفاق أو القدرة المستهلكة، ومعدل سريان الغاز وقيمة الرقم الهيدروجيني، والضغط الجزئي للأوكسجين المذاب. إن السيطرة على درجة الحرارة وسرعة الخفق هي من المتطلبات الأساسية وهي طبعاً مفيدة لإعادة إنتاج وأداء العملية للسيطرة على المتغايرات الأخرى التي أدرجت سابقاً. يتم، في العديد من العمليات الصناعية، تحليل مكونات الغاز العادم (Exhaust gas). تعتبر هذه

العملية آمنة لأن جهاز تحليل الغاز يغذى بفضلات الغاز الناتجة من المفاعل، كما أنها مفيدة لإمكانية تقدير الحالة الأيضية للمزرعة من خلال حاصل التنفس (RQ (Respiratory quotient، انظر الفقرة 6-2-2). إضافة إلى ذلك، يمكن إيضاح محددات نقل الأوكسجين بواسطة طريقة تحليلية تختلف عن قياس pO_2 باستخدام مسبار الأكسجين الذائب. إن سيطرة الأنشوطة المغلقة (Closed-loop control) على المتغايرات مثل الحجم (أو الوزن) للمفاعل، ومعدلات سريان السوائل دخولاً وخروجاً من المفاعل قد تكون حاسمة لنجاح العمليات الحيوية التي تجري بنظام الدفعة أو النظام المستمر.

توضع متحسسات الحرارة والضغط عادة في حاويات منفصلة مصنوعة من الفولاذ الذي لا يصدأ ثم تربط في مكان واضح في المفاعل. تحتوي معظم متحسسات الرقم الهيدروجيني و pO_2 على مسبار حراري لكي تعوض الحرارة المرتبطة بالانحراف المكتسب (Gain drifts) للمتحسسات. على الرغم من أن السلك البلاتيني للمقاومات الحساسة للحرارة (Pt 100 أو Pt 1000: إما 100 أو 100 Ω على 0˚C) مستقر لفترة طويلة (أي أنها دقيقة) فإن بعض المختبرات تطالب بوثائق لتصديق دقتها.

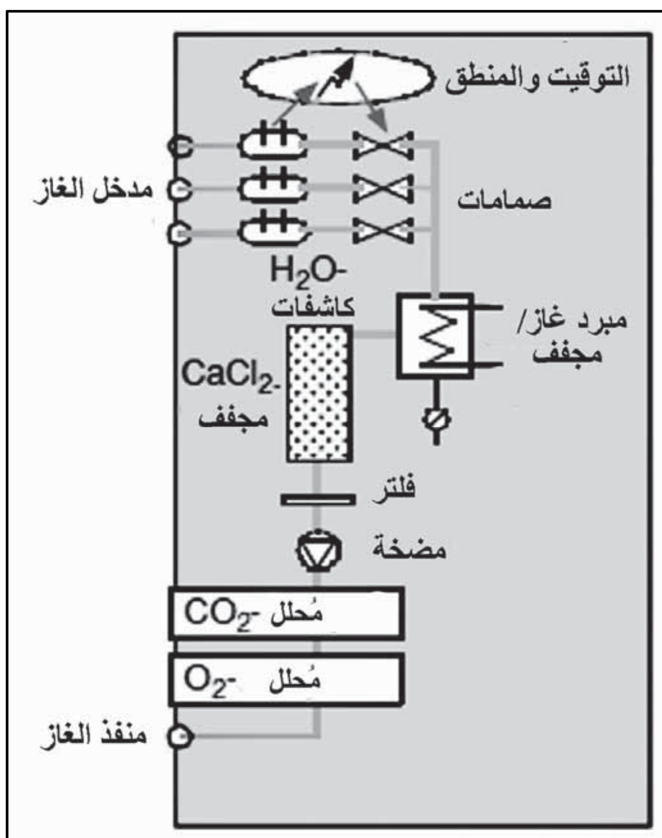
تتوفر في الأسواق متحسسات مقاومة للضغط (Piezo-Resistive) والتي تتصف بكسب معتمد على الحرارة (Temperature-dependent gain) أو تغير في التوازن يبلغ أقل من 2%، علماً أن العديد من متحسسات الضغط المعتمد على الحرارة بشكل كبير لا يزال قيد الاستعمال. نحتاج إلى معرفة الضغط بدقة لأسباب السلامة ولتوثيق عدم حدوث فراغ خلال طور التبريد بعد عملية التعقيم. بالنسبة إلى التفاعلات الحيوية التي تجري تحت الضغط، والتي لازالت الاستثناء وليس القاعدة، فإن الإشارة الصحيحة هي شيء ملزم.

تراقب قيمة pH عادة باستخدام مقياس فرق جهد زجاجي مفرد، يحتوي داخلياً على قطب مرجعي من نوع Ag/AgCl. إن الإشارة المستغلة تكون، حصرياً، الفرق

في الجهد الكهربائي للأقطاب. وبهذا فإن الإلكترولايت المحيط بالقطب المرجعي يجب أن يكون على اتصال كهربائي مع محلول القياس، أي المعلق الحيوي. توجد مقاومة انتشار بين الاثنين يسببها الحجاب الحاجز المسامي في الأقطاب التقليدية والهلام المائي (Hydrogel) في معظم المسابر الحديثة. إن مقاومة الانتشار للهلام المائي كبيرة إلى درجة أنها تمنع تسرب أيونات الفضة $Ag+$. أحياناً تظهر مشكلة، وهي انسداد الحجاب الحاجز بسبب ادمصاص البروتين أو الترسب أو النمو السطحي، مما يصاحبه زيادة في مقاومته الكهربائية بمقدار $G\Omega$ إلى $T\Omega$ وتتغير الإشارة بشكل غير متوقع بقدر قد يصل إلى وحدة pH واحدة في اليوم وسيتدهور زمن الاستجابة (Response time). إن خطر تكسر الزجاج هو شيء غير مقبول في التقنية الحيوية الغذائية. لذا فقد طور العديد من الصناعيين ترانسيستورات حساسة للبروتون وفعالة حقلياً (pH-FET) كبديل للأقطاب الزجاجية. المشكلة الحالية هي التغير الكبير في هذه الترانسيستورات أثناء التعقيم؛ قد يبلغ هذا التغير 80 ملي-فولت أو حوالي 1.5 وحدة pH ولايكون متوقعاً كذلك.

الترسبات التي تحدث على سطح المتحسس يمكن حدوثها كذلك مع أقطاب الريدوكس (Redox electrodes)، التي صنعت بشكل مشابه ولكنها تحتوي في طرفها على معدن نبيل (Au أو Pt) بدلاً من الزجاج الحساس للبروتون. توفر هذه الأقطاب بعض المعلومات المكتلة والمشوشة من التوفر العمومي للإلكترونات؛ علماً أنها مفيدة جداً في تقدير نوعية المزارع اللاهوائية المجبرة.

تراقب قيمة pO_2 عادة باستخدام قطب قياس الأمبيرية (Amperometric) مغطى بغشاء مفرد (يسمى نوع كلارك – Clark-type). لا تعتمد الإشارة على الغشاء فقط، ولكن على مكان القطب في المفاعل أيضاً، وذلك بسبب احتمال وجود تدرج في المفاعل. يجب التأكد من عدم وجود فقاعات غازية محجوزة داخل الغشاء. كما إن نمو الكائنات المجهرية على الغشاء هي ظاهرة معروفة ولكنها نادراً ما تناقش.



الشكل 2.10 مفهوم أساسي لجهاز تحليل الغاز العادم الذي هو كفوء بما يكفي للاستخدام الصناعي. يجب نقل الغاز العادم نحو مداخل محلل الغاز حيث تأخذ المضخة الداخلية عينة دفق مناسبة. أكثر من مدخل واحد يكون عادة موجوداً، من أجل تبادل الاستثمار بين مفاعلات أكثر. عندم يتم إحضار عالق أو رغوة إلى المحلل، يتم كشفها بسرعة وبشكل فردي في كل دخول. يتم منع تسرب المزيد إلى الالة عن طريق تعطيل صمامات لكل منها. اعتماداً على مبادئ قياس محللات O_2 و CO_2، على التوالي، قد يتعين تجفيف الغاز. هذا المخطط يبين تسلسل تجفيف من خطوتين. في أي حال، يستحسن استعمال مرشح غاز موثوق.

بشكل عام، تستعمل هذه الأقطاب كوحدة واحدة لكل مفاعل. فإذا توقف أحدها عن العمل أو تلف أثناء العملية، لا يمكن استبداله إلا إذا علق على بيت ثانٍ حيث يمكن جره إلى داخل الموقع خلال هذه العملية. إن آلات الإيواء (Housing devices) هذه مفيدة في عمليات الإنتاج وللمفاعلات الحيوية الكبرى.

أن تحليل الغاز العادم باهظ الكلفة، ولكنه يستحق العناء. وغالباً ما تستوجب محللات الغاز انتباهاً خاصاً عند استعمالها. إن بخار الماء يتدخل في تحليلات الــ CO_2 التي تعتمد على امتصاص الأشعة تحت الحمراء، ودخول الماء أو الرغوة يمكن أن يكون مخرباً. لهذا، هناك شرط بسيط وهو أن الجهاز أو الآلة يجب أن تتحمل الرغوة وتجفف الغاز (راجع الشكل 2.10). يمكن لآلة واحدة أن تخدم عدة مجاري غاز (Gas streams) وهذا يخفض بشكل كبير كلفة المجرى والمفاعل. ويمكن إذاً أن تحسب المتغايرات التالية من قيم تحليل الغاز، مع الافتراض أن O_2 و CO_2 هما الغازان المتفاعلان الوحيدان (للغازات المتفاعلة الأخرى، تصح مجريات تطبيقات أخرى مشابهة): إن معدل أخذ الأوكسجين (OVR) ومدى تطور الــ CO_2 (CER) للمفاعل يحصل عليهما من خلال توازنات كتلية. فإذا كان حجم التشغيل (V_L) معروفاً، فإن مدى نقل الأوكسجين (OTR) ومدى نقل الــ CO_2 (CTR) يمكن أن يحسب إذا كان تركيز الكتلة معروفاً، ويمكن اشتقاق المجالات الخاصة باستهلاك الأوكسجين (qo_2) وإنتاج الــ CO_2 (q_{co_2}). وتعتمد الحسابات على توازنات كتلية (Mass balances). إننا بحاجة إلى توازنين كتليين لكل غاز، واحد للطور الغازي وآخر للطور السائل:

$$\frac{d(V_G y_G)}{dt} = \text{MAFR}^{\text{in}} y^{\text{in}} - \text{MAFR}^{\text{out}} y^{\text{out}} \mp \text{transfer}_{G \leftrightarrow L} \quad (1.10)$$

$$\frac{d(V_L c_L)}{dt} = \pm \text{transfer}_{G \leftrightarrow L} \mp q V_L x \, [+\text{transport via liquid phase}] \quad (2.10)$$

حيث G و L يمثلان طور الغاز أو السائل، على التتابع. وV هو حجم الطور ذو العلاقة. و y هي جزء المولار للأكسجين أو CO_2 في الطور الغازي: C هو تركيز الغاز المذاب. MAFR هو مختصر لمعدل سريان كتلة من الهواء (يفترض تحديدها بواسطة عداد سريان الكتلة). و q هي المعدل الخاص لاستهلاك الغاز (سلبي: q_{o_2}) أو للإنتاج (إيجابي: q_{co_2}). لاحظ أن عبارة "transfer $_{G\text{--}L}$" لها إشارات مختلفة في التوازنات الكتلية: في واحدة منها هي مصدر (Source)، وفي الأخرى هي مغطس (Sink). إن التحول من خلال طور السائل يمكن أن يفكر به في مزارع غير الدفعة،

ولكن حتى في تلك الحالة، يمكن إهماله باتخاذ حالة زائفة الثبات (Pseudo-steady) (أي تفاضليات التلاشي) وباستبدال لعبارة $\text{Transfer}_{G\text{--}L}$ نحصل على:

$$qV_L x = -\text{MAFR}^{\text{in}} y^{\text{in}} + \text{MAFR}^{\text{out}} y^{\text{out}} \tag{3.10}$$

عدادات جريان الكتلة ليست رخيصة، وتعمل بشكل موثوق أكثر مع الغاز الجاف، ولهذا يتم مراقبة الــ MAFR^{in} (الداخل) فقط، ولكن تبقى هناك حاجة إلى MAFR^{out} (الخارج) أيضاً. لايزال ممكناً حل المعادلة بافتراض أن كل مكونات طور الغاز خاملة، ماعدا O_2 و CO_2، لذا فالغاز الخامل الداخل يجب أن يخرج في ظروف زائفة الإستقرار:

$$\text{MAFR}^{\text{in}} y^{\text{in}}_{\text{inert}} = \text{MAFR}^{\text{out}} y^{\text{out}}_{\text{inert}} \tag{4.10}$$

بما أنه بات معروفاً بأن قيم الــ Y_{inert} (الخامل) هي $(1-Y_{O_2} - Y_{CO_2})$، يستطيع المرء أن يحسب الــ MAFR^{out}.

تحدد القيمة التنفسية (Respiratory Quotient) (RQ) كنسبة مولارية (q_{co_2}/q_{o_2}). علماً، أن هذا يبقى صحيحاً بالنسبة إلى معدل الإنتاج إلى معدل الأخذ (Uptake) في كل المفاعل: ولحساب القيمة التنفسية، ليس هناك حاجة إلى معرفة كثافة الكتلة الحيوية وحجم التشغيل. بالإضافة إلى ذلك، ليس هناك حاجة إلى معدل سريان كتلة الهواء، ويمكن حساب القيمة التنفسية مباشرة من معلومات تركيبة الغاز فقط:

$$\text{RQ} = \frac{y^{\text{out}}_{\text{CO}_2} - y^{\text{in}}_{\text{CO}_2}}{y^{\text{in}}_{\text{O}_2} - y^{\text{out}}_{\text{O}_2}} \tag{5.10}$$

أو:

$$\text{RQ} = \frac{y^{\text{out}}_{\text{CO}_2} - y^{\text{in}}_{\text{CO}_2} - y^{\text{in}}_{\text{O}_2} y^{\text{out}}_{\text{CO}_2} + y^{\text{out}}_{\text{O}_2} y^{\text{in}}_{\text{CO}_2}}{y^{\text{in}}_{\text{O}_2} - y^{\text{out}}_{\text{O}_2} - y^{\text{in}}_{\text{O}_2} y^{\text{out}}_{\text{CO}_2} + y^{\text{out}}_{\text{O}_2} y^{\text{in}}_{\text{CO}_2}} \tag{6.10}$$

تكون الصيغة الأبسط (5.10) صحيحة إذا كانت قيمة (RQ) قريبة من 1 (أو $MAFR^{out}$ $MAFR^{in}$ ~_). علماً، إذا كانت قيمة (RQ) تختلف معنوياً عن 1، عندها يجب أخذ توازن الغاز الخامل بعين الاعتبار، وعندها يجب حساب (RQ) باستخدام الصيغة المطولة (6.10). لاحظ، في هذا السياق أن المحاليل الفيزيائية للغازات فقط هي التي تؤخذ بعين الاعتبار. قد يكون ضرورياً شمول تفاعلات كيميائية إضافية في توازنات الكتلة. مثال ذلك، الامتزاز الكيميائي للـــ CO_2 إلى ثنائي البيكاربونات أو حتى الكربونات عند قيم pH أعلى.

من الصعوبة قياس أحجام السوائل المخفوقة أو المنشورة كغاز في المفاعلات بشكل دقيق بواسطة قياس المستوى (Level measurement)، خاصة إذا كان هناك غطاء من الرغوة على سطح السائل. الحل الوحيد المعتمد لهذه المشكلة هو تحديد كتلة السائل باستخدام موازين. إن معرفة الكتلة يسهل من عملية حساب توازنات الكتلة في حالة كتلة المفاعل، لذا، علينا التأكد من أن جميع الارتباطات من وإلى المفاعل مثبته بشكل قوي وجيد بحيث لا تتحرك أثناء العملية.

يصح هذا كذلك على تحديد معدل سريان السوائل. إن نقصان كتلة خزان التجهيز أو زيادة في كتلة خزان الحصاد بمرور الزمن، يمكن أن يحسب وبسهولة على معدل سريان الكتلة.

الرغوة هي من بين المتغايرات التي يصعب تحديد كميتها. ويختلف سلوك الرغوة في السوائل المنشورة بالغاز مع الوقت. وإن للغاز تأثيراً كبيراً على النقل الكتلي بسبب اندماج فقاعاته وعلى حيوية الخلايا المحجوزة في الرغوة. مع ذلك، فلا توجد طريقة أوتوماتيكية معقولة لإجراء قياسات نوعية أو كمية لهذه العمليات. تجري عملية السيطرة على الرغوة عادة باستخدام مكسرات/عازلات الرغوة الميكانيكية أو بإضافة عوامل كيميائية مضادة للرغوة. يمكن أن تكون تزود هذه الإضافات بشكل مستمر أو متقطع، وهي تتحرك عادة بسيطرة الأنشوطة المفتوحة، أو أنها تطلق بواسطة إشارة من متحسس أثناء تكسير الرغوة. هذا ولاتوجد قواعد موضوعية لاختيار عامل ضد الرغوة يكون أكثر فعالية؛ إنما النجاح هو مسألة حدس جيد أو مسألة متروكة للتجربة والخطأ.

4.10 تقنيات المراقبة غير القياسية

Non – standard monitoring techniques

يمكن لبعض المتحسسات غير القياسية أن تعمل وهي في الموقع (In situ)، ومعظمها عبارة عن أجهزة، وليست متحسسات، وتحتاج إلى أخذ نماذج أو إلى تحضير النماذج قبل الاستعمال (انظر الشكل 3.10). توجد أسباب عديدة لعدم اعتبار هذه التقنيات قياسية بعد، ومنها:

- غياب التقويم المرجعي (Calibration reference).
- الحاجة إلى ربط أو توقيت الآلة بهيئة فاعلة للحصول على جهاز فعال لا يتوفر في الأسواق.
- تعقيد الأجهزة سطوحها البينية بين الجهاز والطريقة الإجرائية (Process).
- الحاجة إلى صيغ أو نماذج مصدقة ومقومة قياسياً بصورة خاصة.

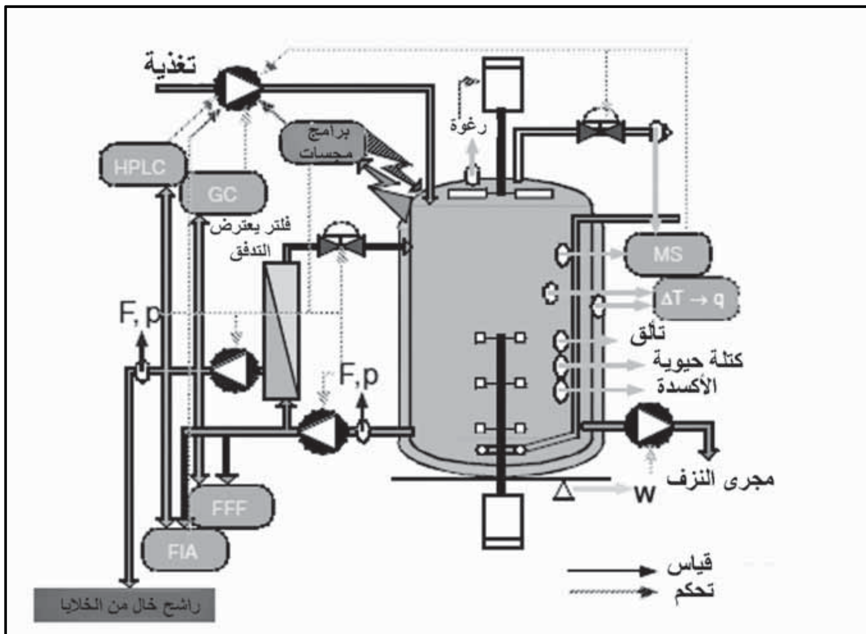
1.4.10 المتحسسات ذات العلاقة بالكتلة الحيوية

Biomass – related sensors

المتحسسات المصممة لتحديد الكثافة الضوئية (OD) يمكنها أيضاً أن تكشف الفقاعات الغازية، وكذلك لون الوسط والحبيبات الأخرى، عدا الخلايا، بغضّ النظر فيما إذا كانت تقيس امتصاص أو تشتت أو انعكاس الضوء. إن التأثير غير المرغوب به قد يفوق شدة الإشارة المرغوبة بكثير. إن الطول الموجي للضوء المستخدم يكون عادة قريباً جداً من الأشعة تحت الحمراء، لأن هذا الطول الموجي يحسن شدة الإشارة لمعظم الخلايا الميكروبية (تكون الأبعاد الحيزية (Spacial) حوالى أربع مرات بقدر الطول الموجي) وهذا يقلل من الضوء الممتص من قبل الوسط. لاحظ، إذ كانت الخلايا تتواجد على شكل كيانات كبيرة، مثل المايسيليا أو الكريات المرّسبة (Pellets)، فإن قراءات الكثافة الضوئية لا تكون مجدية. من

الضروري أيضاً طرد كل الفقاعات الغازية من مسار الضوء، وكذلك إزالة الأغشية الحيوية والترسبات من الشباك الضوئي لجهاز المطياف وبصورة دورية. لا يمكن لأي متحسس للكتلة الحيوية أن يفرق بين الخلايا الحية والخلايا الميتة أو حطام الخلايا: فهذه المتحسسات تعطي تقديراً كلياً للكتلة الحيوية، ولكن بدون معلومات نوعية.

التألق (Fluorescence) هي صفة مميزة لبعض الجزيئات. وحاملات التألق (Fluorophores) المجهري المهمة في الخلايا هي النوع المختزل من مادة Nicotinamide dinucleotides (NADH و NADPH)، والأحماض الأمينية الأروماتية والعديد من الفيتامينات.



الشكل 3.10: متغايرات العملية الحيوية لا تراقب عادة، ولكنها مع ذلك تعتبر امتدادات مرغوبة للمعيار: الكتلة الحيوية: متحسس الكتلة الحيوية؛ التألق = متحسس التألق (F و P هي معدل السريان والضغط على التوالي)؛ الرغوة = كاشف الرغوة وتفعيل ضاغطة الرغوة الميكانيكية؛ FFF = تجزئة سريان المجال؛ FIA = محلل حقن السريان؛ GC = الكروماتوغرافيا الغازية؛ و HPLC = الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء؛ وMS = مقياس الطيف الكتلي (يمكن ربطه لكلا الطورين السائل والغازي)؛ ريدوكس = متحسس الريدوكس؛ متحسسات البرامجيات

هي متغايرات محسوبة؛ W = الوزن؛ TΔ = الفرق بدرجة الحرارة بين المعلق الحيوي وماء الغلاف (يمكن حساب سريان الحرارة (q) منه)؛ يمكن إنتاج نافذ خالٍ من الخلايا بواسطة مجرى خارج من المفاعل، ويمر خلال مرشح السريان العرضي. يشار إلى القياس (أو المراقبة) بواسطة أسهم عريضة، ويؤشر إلى أفعال المراقبة بأسهم ضيقة نحو المشغل المعني (صمامات، مضخات، محرك).

وما دامت تراكيز هذه المواد ثابتة داخل الخلايا فإن شدة التألق سيتناسب مع الكثافة الخلوية. علماً أن هذه العلاقة ليست خطية عند الكثافات الخلوية العالية. كذلك، فإن التراكيز الخلوية لحاملات التألق المواد ثابتة داخل الخلايا فإن شدة التألق سيتناسب مع الكثافة الخلوية. علماً أن هذه العلاقة ليست خطية عند الكثافات الخلوية العالية. كذلك، فإن التراكيز الخلوية لحاملات التألق (Fluorophores) ليست ثابتة، وبذلك قد تتغير بشكل كبير وسريع. إن هذا الشيء يجعل عملية إيجاد علاقة صحيحة بين إشارة التألق والكثافة الخلوية شيئاً مستحيلاً. وعلى الرغم من ذلك، فإن المعلومات التي تحتويها إشارة التألق مفيدة جداً في الكشف عن التغيرات الفسلجية السريعة (عوضاً عن تركيز الكتلة الحيوية).

تهدف عملية استخدام أجهزة مطيافية المعاوقة الكهربائية (Electrical impedance spectroscopy) إلى تقدير مجموع الحجوم السائلة المحاطة بأغشية قابلة للاستقطاب Polarisable (خلايا سليمة) واقعة أمام المتحسس. حيث تعمل الخلايا كمتسعات مجهرية في حقل كهربائي متبادل. إن التغير في السعة القابلة للقياس هو تقدير للحجم الخلوي المتكامل. ويعتمد تردد حدوث هذا الشيء على توزيع الحجم المفرد (= الحجم) للخلايا في المعلق. وهنا نحتاج مرة أخرى إلى تقويم متخصص. تعمل الأجهزة المتوفرة تجارياً عند تردد مفرد ومحدد مسبقاً فقط. ويتم تطوير أجهزة يمكن توليفها (Tuned). وبمثل هذه الأجهزة يمكن إجراء تحليلات كيميائية لنتائج الطيف. يتجاوز هذا المبدأ التداخلات المتسببة بواسطة مكونات الأوساط غير الذائبة أو المترسبة، ولكنها حساسة أيضاً إلى الفقاعات الغازية. علماً، أن هناك نوعاً آخر من التداخلات وهي قابلية التوصيل (Conductivity) للوسط والتي تتغير عبر الزمن وتؤدي إلى تقصير دارات (Short-circuits) المتسعات. طريقة جديدة أخرى للفحص الضوئي للمعلقات الحيوية هو المجهر الموضعي (In situ) بالارتباط مع تحليل

الصور (Image analysis). إن التطبيقات النموذجية لهذه الطريقة هي في عدِّ الخلايا وتحديد أحجامها، وتوصيف الشكل، والملمس أو حركة الخلايا. ولقد تم وبنجاح تحليل أشكال خيطية معقدة مختلفة بتقنيات التحليل الصوري.

والرسالة التي يجب أن نتعلمها من كل هذا هي: أن هذه المتحسسات ليست عديمة الجدوى، فالإشارة الناتجة منها يمكن أن تترجم إلى معلومات كمية مفيدة من خلال تقويم يدوي (Off-line Calibration) مصمم خصيصاً للنظام عندما يحافظ على جميع ظروف التشغيل بشكل ثابت. من الصعب الحصول على قيم مطلقة، ولكن الاستعمال النسبي للمقارنة يكون قيماً. وبكلمات أخرى، إن مثل هذه الإشارات قد تكون مفيدة جداً (أثبت ذلك صناعياً) في العمليات التي تجري دائماً بنفس الطريقة.

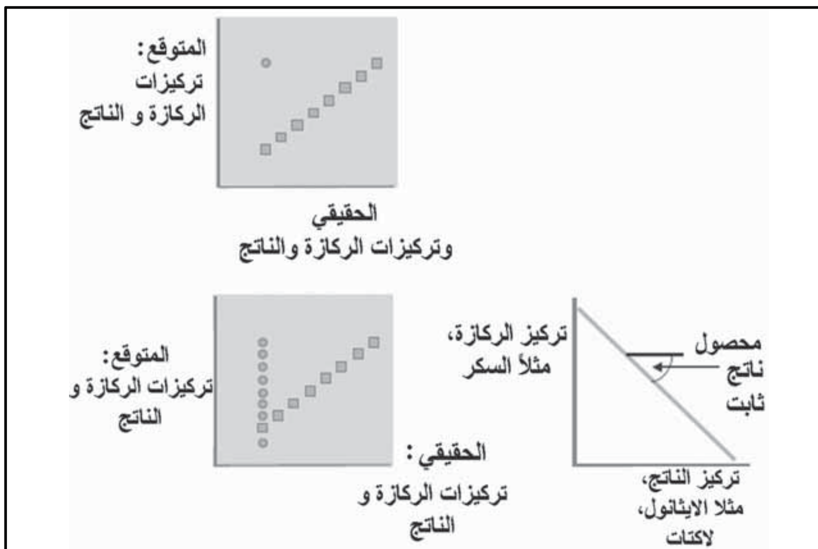
2.4.10 الطرق التي لها علاقة بمكونات مفردة

Methods related to individual Components

من التقنيات الجديدة نسبياً في مراقبة العمليات الحيوية، هي استخدام مجهر التحليل الطيفي (Spectroscopy) الذي يستخدم الأشعة تحت الحمراء القريبة والمتوسطة المدى (Near and mid-range infrared spectroscopy) (NIR و MIR). باستخدام مجهر التحليل الطيفي، يمكن الحصول على معلومات تحليلية بطريقة غير تداخلية، وبدون الحاجة إلى التماس المباشر بين النموذج وعنصر التحسس (استخدام الألياف أو الموصلات الضوئية). ومن الفوائد الأخرى لهذه العملية انخفاض أعمال الصيانة المطلوبة أثناء العملية وإمكانية تحليل عدة نماذج بنفس الوقت. نشأت المعلومات الكيميائية في (NIR) من تحولات في شدة وارتباط تذبذب كل من NH, OH، و C-H وتحدد على مدى موجات من 5000 إلى 4000/سم. يتوقع الحصول على امتصاص أقوى وخصائص طيف مميزة عند استعمال مجهر التحليل الطيفي (MIR) في عدد موجات يتراوح بين 800 و 2000/ سم. علماً، أن الامتصاص القوي للماء يؤدي إلى عمق اختراقي قصير جداً للأشعة (خاصة حول مدى 1600 و 3300 سم). وعليه يفضل استخدام عناصر انعكاس تام مضعفة (Attenuated total reflection (ATR) elements).

تعتمد المعلومات الطيفية على تذبذب وتمدد أواصر C-O مختلفة. وفي جميع الحالات تتداخل المعلومات الطيفية من كل مكونات الوسط وتنتج طيفاً بالغ التعقيد. بعدها يجب تحليل هذه الأطياف بواسطة طرق قياس كيمائية.

إن التحليلات اليدوية (Off-line) لنتائج التخمير وتحليل الخلائط المخلقة لمكونات مرغوبة تستخدم كثيراً لتكوين صيغ تقويم مصممة خصيصاً للعملية. باستخدام هذه الصيغ، إذا تم تصديقها، يمكن تفسير الأطياف التي يحصل عليها أوتوماتيكياً (On-line). وينبغي أن يستند نموذج المعايرة (صيغ التقويم) بدقة إلى الخصائص الطيفية الفريدة للمادة المعينة المراد تحليلها. ويمكن اختبار نماذج المعايرة هذه يدوياً (Off-line) بإضافة (Spiking) مكونات مختلفة إلى العينة الحقيقية: الصيغة المفيدة هي التي ستتوقع تغييراً في تركيز المكون المضاف فقط (انظر الشكل 4.10). لقد تم وبنجاح مراقبة الأحماض العضوية والسكريات والكحولات والبوليمرات الحيوية بصورة أوتوماتيكية (On-line). وتصح نفس اعتبارات التصييغ والتقويم على تحليل المواد الطيارة (Volatiles) التي تجري باستخدام الأنوف الإلكترونية (Electronic noses).



الشكل 4.10: طريقة مقترحة لاختبار صيغ ونماذج التعيير (calibration). يجب إضافة مواد مختلفة مرغوبة إلى نماذج من المزارع. بعدها يمكن معرفة اختلافات التركيز للمادة المفسدة

بشكل دقيق (أي، القيم الحقيقية) ويجب على صيغة التقويم أن تتوقع هذا السلوك (مربعات)؛ بنفس الوقت يجب أن لا تتوقع تغيراً في المكونات أخرى (دوائر؛ واحدة فقط تظهر في الشكل الأعلى). وإذا تم توقع إختلاف في أي مكونات الأخرى (دائرة في الشكل الأسفل على اليسار)، فمن المحتمل جداً أن الصيغة لا تتوقع علاقات تحليلية؛ وإنما قد تم تدريبها لتوقع علاقات حيوية (Biological relation)، على سبيل المثال، زيادة تركيز المنتوج عند نقصان تركيز المادة الأولية (الأسفل إلى اليمين). في الحالة الأولى، يحتمل أن تكون الصيغة مفيدة؛ في الحالة الأخيرة يجب إهمال الصيغة.

إلى جانب المتحسسات والأنظمة التي نوقشت أعلاه، هنالك العديد من أجهزة التحليل المفيدة لمراقبة العمليات الحيوية أوتوماتيكياً؛ ولكن يجب توفر الواجهة البينية المناسبة. يمكن لهذه الواجهة أن تعمل حسب واحد من أربعة مبادئ مختلفة:

1. يؤخذ نموذج من العالق الحيوي الكامل بصوره أوتوماتيكية ومن دون التأثير في الخلايا (أي، تبقى الخلايا حية ونشطة).
2. يؤخذ نموذج من العالق الحيوي الكامل بصورة أوتوماتيكية ويتم تثبيط نشاط الخلايا أثناء أخذ النموذج.
3. يؤخذ نموذج من الرائق أو الراشح (Permeate) بعد إزالة الخلايا.
4. المادة التي يراد تحليلها هي مادة متطايرة، ويمكن تحديدها من الطور الغازي الذي يؤخذ منه النموذج بعد ترشيح الغاز العادم (أي، ما بعد الحاجز المعقم).

في الحالتين الأولى والثانية، تمثل مضخة أو صمام الحاجز المعقم، ويجب أن تعمل باتجاه واحد فقط. علاوة على ذلك، فإن الصمام يجب أن يحتوي على الحد الأدنى من الحجم الميت (Dead volume) ويجب أن يصمم بطريقة بحيث يمكن تنظيف وتجفيف الحجم الميت موضعياً (*In situ*) وذلك لكي نتجنب نقل مخلفات من نموذج إلى آخر. هذا وقليل من هذه الصمامات متوفرة تجارياً. يجب أن تعمل المضخة باستمرار وبمعدل سريان أدنى لنتجنب النمو الرجعي (Back growth)

للملوثات. إذا لم يتم اتخاذ أي إجراءات أخرى، وإذا كان متوسط وقت البقاء (Residence time) في خط أخذ النماذج منخفضاً بشكل كبير، فإن الخلايا ستبقى سليمة، ويمكن تحديد النشاطات الخلوية في النماذج المأخوذة. يجب توخي الحذر عند أخذ النماذج لتجنب تعريض المعلق الحيوي إلى ظروف محدودية الأوكسجين.

تشير الحالة (2) إلى تثبيط نشاط الخلايا: ويمكن فعل ذلك بواسطة تسخين أو تبريد خط النموذج أو بواسطة الخلط المستمر لمجرى النموذج مع محلول مثبط للفعالية، مثل (KCN). يؤدي هذا إلى تثبيط نشاط، وربما إلى تخفيف النموذج وهو مفيد فقط إذا أريد تحليل المواد الأولية أو نواتج أو مواد أيضية مفرزة. يجب غسل خط أخذ النماذج بصورة دورية باستخدام محلول تنظيف، مثل القواعد أو الحوامض، لإزالة الأغشية الحيوية أو بقايا الخلايا أو المواد المترسبة.

تشمل الحالة (3) إزالة الخلايا من السائل، وغالباً ما يتم ذلك من خلال الترشيح وليس بالنبذ المركزي. يمكن تركيب المرشحات موضعياً (In situ) أو بمعزل عن المفاعل. في الحالة الأولى، يجب تركيب المرشح في منطقة من المفاعل عالية الاضطراب لتجنب توحيل أو حدوث الترسبات (Fouling) على المرشح. يمكن أن يشغل المرشح بواسطة الضغط العالي في المفاعل أو باستخدام مضخة ماصة للراشح. في حالة استعمال مضخة، فهناك حاجة إلى مضخة إضافية لتدوير المعلق الحيوي خارج المفاعل وعبر المرشح. يزداد تركيز الخلايا في المعلق بعد إزالة الراشح وإعادة تدويره إلى المفاعل؛ إن نظام استبقاء الخلايا تحليلياً (Analytical cell retention system) هذا يؤدي إلى زيادة تركيز الكتلة الحيوية، ويجب أن يؤخذ بعين الاعتبار في الامتدادات المناسبة لميزان الكتلة. يجب أن تكون كامل المنظومات أقرب ما يكون إلى المفاعل لتقليل حجم المجرى ومتوسط وقت بقاء الخلايا خارج المفاعل. كما يجب اختيار سرعة السائل لتكون مناسبة للسريان العرضي (Tangential Flow) (أي سريان المائع عبر الغشاء بسرعة تزيد على 2 m/s). كما يجب ضخ الراشح بقوة واستمرار لتجنب عودة نمو الملوثات، التي كانت ستؤدي إلى تغير في التركيبة الممثلة للراشح.

الحالة (4) هي حالة خاصة، ويقتصر استعمالها على المواد المتطايرة فقط، مثل المذيبات وبعض الاسترات أو الأحماض. ربما تكون هناك حاجة إلى تسخين خط أخذ النموذج لتجنب تكثيف الماء و/أو المواد التي يراد تحليلها. يمكننا أن نفترض تشبع الطور الغازي إذا كان معدل التهوية منخفضاً بشكل معقول، وبهذا يمكننا حساب تركيز الطور السائل من تركيز الطور الغازي إذا كان سلوك الفصل بين الطورين معروفاً. الأجهزة التي يجب ربطها إلى العملية الحيوية عن طريق الوصلات المذكورة أعلاه يمكن أن تكون:

- محللات حقن السريان (Flow injection analysers-FIA).
- كروماتوغراف (للغازات والسوائل).
- وحدات ترحيل كهربائي (Electrophoresis units).
- مقاييس الطيف الكتلي (Mass spectrometers).
- إنوف إلكترونية (Electronic noses).
- أجهزة تجزئة سريان المجال (Field flow fractionation devices)

لسوء الحظ، فإن معظم المجهزين يبيعون الأجهزة (ومن ضمنها الكومبيوتر المسيطر على العملية) فقط، ولا يبيعونها مع وصلة مفيدة أو كحل لمشكلة تحليلية خاصة. لهذا، فإن هناك حاجة إلى أشخاص ذوي معرفة بالعملية وقد يكون هذا هو العائق الذي يمنع هذه التقنيات التحليلية من أن تصبح تحليلات قياسية للعمليات الحيوية.

إن أكثر الأدوات المستخدمة لإيجاد حل للمشاكل التحليلية هي محللات حقن السريان (FIA) لأنها تسمح بالتكامل بين أي تداخلات في التفاعلات الفيزيائية أو الكيميائية في نظام السريان. كل الأدوات الأخرى تكون أكثر تخصصية، وبهذا فهي محددة في استعمالها لمجاميع محددة من المواد المراد تحليلها. إن المكونات الأساسية في جهاز (FIA) هي نظام نقل السائل ونظام التبديل المتكون من أنابيب

ومضخات وصمامات ومجرى ناقل الذي يحقن فيه النموذج أوتوماتيكياً بواسطة نظام تقني. وحسب الوقت المطلوب لمثل هذا التتابع، فإن النتائج تظهر بأوقات محددة وليس بطريقة مستمرة. علماً أنه يمكن الحصول على النتائج بصورة مستمرة إذا كان بالإمكان حذف أي حقنة.

إن مبدأ عمل جهاز محلل حقن السريان FIA موضح بالشكل (5.10). وإن التفاعل الكيميائي أو الكيموحيوي، الذي هو نموذجياً للمادة التي يراد قياسها، يحدث أثناء السريان خلال الأنبوب (أي بشكل مفاعل من نوع سريان السدادة – Plug flow type reactor). وفي هذا النظام يمكن إجراء المعالجات الفيزيائية للنموذج، مثل التخفيف والاستخلاص والفصل والانتشار، بسهولة. أهم هذه المعالجات هو التخفيف، عندما يحقن حجم معلوم من النموذج في مفاعل حوض مخفوق (صغير جداً) والذي يسري خلاله مائع ناقل مستمر. يجب إزالة الغاز بالكامل من النموذج المحقون قبل عملية الحقن، ويفترض أن يخلط جيداً ويخفف بواسطة المائع الناقل مع الوقت. كذلك يجب تحديد توزيع وقت البقاء لهذا المفاعل المخفف بصورة منفصلة، ولكن يمكن الافتراض ببقائة ثابتاً تحت ظروف عمل مماثله. وتكون النتيجة، على سبيل المثال، التخفيف ألف مرة في أقل من دقيقة وبنسبة دقة أكثر من 99%.

تقاس المنتوجات أو المواد الأولية (والمساعدة) الباقية بواسطة جهاز كاشف. ويكون الكاشف غالباً جهازاً ضوئياً أو كهربائياً (جهاز قياس شدة الضوء (Photometer)، أو قطب تحليل استقطابي (Polarographic Electrode)، ولكن يمكن أن يعتمد القياس على تفاعلات أنزيمية أو مناعية (متحسسات حيوية)، أو قياس الريدوكس، أو استخدام أجهزة تحليل معقدة وقوية مثل قياس الطيف الكتلي (Mass spectrometers)، أو قياس الخلايا السارية (Flow cytometers). يوضح الشكل (5.10) مثلين بسيطين على ذلك. وليس هناك احتمالية للتداخل مع الحاجز المعقم، لأن الجهاز بالكامل يعمل خارج الحيّز المعقم.

الشكل 5.10 مثالان لاستغلال تحليل حقن السريان في مراقبة العملية الحيوية. (أ) تحديد السكروز. يحضر مجرى نموذج صغير بشكل مستمر بواسطة ترشيح السريان العرضي، ثم يزال منه الغاز عن طريق غشاء انتشار المحلول ويضخ بنمط مقاس، إلى صمام الحقن (1) لغرض تحميل أنشوطة الحقن (في نمط التقويم، سيوفر صمام الانتقاء محلول تقويم). يدار الصمام (1) (باتجاه عقارب الساعة للحقن) وبشكل دوري لفترة كافية لدفع سدادة النموذج من الأنشوطة إلى مفاعل التخفيف التالي. بعد إعادة الصمام إلى موقعه فإن المجرى الناقل سيخفف النموذج في مفاعل الخلط هذا. يحمل السريان الخارج على أنشوطة الحقن للصمام (2) الذي يدار (باتجاه عقارب الساعة للحقن) بفترة مناسبة بعد الصمام (1)، عادة بعد الوصول إلى التخفيف المرغوب للنموذج. بعد إعادة الصمام إلى مكانه، يدفع المجرى الناقل للنموذج المخفف خلال ثلاثة أعمدة معبأة بأنزيمات مقيدة الحركة. يوجد في الأول الأنزيم Invertase الذي يحلل السكروز إلى α - D جلوكوز و β − D جلوكوز إلى Gluconolactone و H_2O_2. يمكن تحديد المركب الأخير

في السريان بواسطة كاشف، مثلاً قطب قياس أمبيري، ولكنّ هناك طرقاً أخرى ممكنة أيضاً. يجب تجهيز المادة الأولية المساعدة O_2 بواسطة المجرى الناقل ويجب أن لا يكون التجهيز محدداً. ولهذا السبب تكون خطوة التخفيف السابقة مهمة جداً: وبذلك يمكن توسيع المدى الديناميكي لعدة درجات تضخم (ب) مجرى نموذج صغير للمعلق الحيوي، أي محتوي على الخلايا، ينقل من المفاعل وبعدها يزال الغاز منه بواسطة آلية بسيطة للسريان الإضافي، يضخ جزء صغير من هذا إلى مفاعل خلط صغير حيث تخلط الخلايا مع الماء (لتخفيف المناسب) ومع الإيثانول (لتثبيت الخلايا) الذي ينفذ (Permeabilise)، إلى الخلايا. بعد ذلك يضاف محلول صبغي خاص لفترة تجعله ينتشر إلى داخل الخلايا، هذه الفترة محددة بمعدل وقت البقاء في اللفة ويتفاعل في هذه الحالة إلى DNA. يحدد كاشف السريان، الذي يلي، درجة شدة التألق، التي هي مقياس لتركيز DNA في مجرى النموذج المخفف. إذا كان الكاشف هو كاشف سريان الخلايا، فإنه يحلل كل خلية على انفراد، ويتم تقييم انتشار الخلايا.

علماً، أنه يجب إعطاء اهتمام خاص لمنطقة اتصال أداة أخذ النماذج مع الحاجز المعقم ولإزالة الغاز من النماذج التي يراد حقنها. من السهولة أن يحقق جهاز محلل حقن السريان متطلبات التصديق (Certification) وذلك لإمكانية (نظرياً) إجراء مبادئ قياس بديلة على التوازي، التي تساعد في استبعاد الأخطاء التي قد تنشأ من المادة الأساس المعقدة.

تستخدم المتحسسات الحيوية وبشكل متزايد ككواشف في أجهزة تحليل حقن السريان. إن مساوئ المتحسسات الحيوية مثل انخفاض المدى الديناميكي وعدم القدرة على مقاومة التعقيم وقصر فترة العمل...، إلخ، عندما تستعمل بشكل موضعي (In situ) لا تكون مشكلة عند استعمال هذه المتحسسات خارج المفاعل (Ex situ) لأن هناك وصلة بين جهاز تحليل حقن السريان وهذه المتحسسات التي يمكن تغيرها في أي وقت، وأن جهاز تحليل حقن السريان يمكن أن يوفر نماذج في أفضل التخافيف. هذا ويمكن اختزال الحاجة، وبشكل كبير، للمواد الكيميائية عند استخدام المتحسسات الحيوية.

من الصفات المميزة لأجهزة تحليل حقن السريان مدى تطبيقاتها. ويمكن إعتبارها كتقنية عامة لتناول المحلول، وليس كمتحسس مميز. وهذا يؤدي إلى مرونة كبيرة في مجال الطرق التحليلية. ولكن هناك ضرورة كبيرة ومرغوبة

للمكننة. ويتوقع أن تصبح هذه الأجهزة أحد أكثر الأجهزة أهمية للمراقبة الكمية في العمليات الحيوية، إذا استعملت صيغ تقويم غير خطية وتحسنت تقنيات تقييم النتائج، ومن ضمنها تطوير عملية كشف الأعطال الأوتوماتيكية لجهاز التحليل. وإن التوجهات الحالية هي استخدام أجهزة تحليل حقن السريان ذات قنوات متعددة تعمل بحقنات متوازية أو متعاقبة، أو بتصغير أجهزه الخزن السريع وجعلها أوتوماتيكية.

يمكن أن ينظر إلى معظم أجهزة التحليل المدرجة أعلاه على أنها حالات خاصة من جهاز تحليل حقن السريان (FIA). ففي الكروماتوغرافيا، تحذف التفاعلات ويحدث الفصل في عمود مناسب. وقد يكون الناقل سائلاً (HPLC) أو غازاً (GC). أما في الترحيل الكهربائي الشعري (Capillary electrophoresis)، فيحدث الفصل من دون طور الاستقرار. وبالنسبة إلى أجهزة تجزئة سريان المجال، فإن بعض الأنواع تكون أكثر بطءاً في مسارها على طول قناة السريان مقارنة بالأنواع الأخرى، بسبب تأثير المجال العمودي (Perpendicular field)، على سبيل المثال، المجال الجذبي، أو المغناطيس، أو الكهربائي أو السرياني. هذا ويجب إزالة الغاز تماماً من النماذج قبل حقنها إذا كان الهدف الحصول على معلومات كمية غزيرة.

أجهزة تحليل طيف الكتلة (Mass spectrometry) وقياس الخلايا السارية (Flow cytometry) الأوتوماتيكية هي خاصة إلى حد ما في استخدامها. فإن جهاز تحليل طيف الكتلة يعمل تحت ظروف خواء (تفريغ) فقط. وبهذا، يتوجب استعمال قفل الضغط مع وصلة بينية لأخذ النماذج المعقمة. وهذه يمكن أن تكون بشكل أنبوب شعري بسيط بفتحة صغيرة للغازات، أو بشكل غشاء انتشار محاليل المواد المتطايرة الذائبة. وبما أن أداء الوصلة يتغير مع الزمن، فإن هذا قد يؤثر في تردد الإشارة المقاسة، ويكون من الحكمة إقران نسب الإشارات المستحصلة عن المتغايرات بالإشارات المستحصلة من إمرار مكونات خاملة، مثل N2 أو Ar. عندها، ستعطي الإشارة المعدلة معلومة كمية مطلقة، وإلا، فسنحصل على قيم نسبية فقط.

إن استخدام جهاز قياس الخلايا السارية (Flow cytometry) هي تقنية معروفة تستخدم لإجراء فحوصات لنماذج خارج المفاعل (Off-line). وإذا استخدم هذه الجهاز بالارتباط مع جهاز تحليل حقن السريان (FIA) كطريقة لأخذ وتحضير النماذج، عندها يمكن أيضاً استخدامه أوتوماتيكياً ضمن المفاعل (On-line). تكمن قوة هذه التقنية في إعطائها معلومات متفرقة، أي وصف كمي لتوزيع الخلايا. وتعتمد هذه الطريقة على إجراء عدد كبير من القياسات لعدد ومواصفات خلايا مفردة، مثلاً يمكن إجراء 10^4 قياساً في الثانية. في هذه التقنية ترصف الخلايا منفردة بواسطة أنماط من السريان الهيدروديناميكي المسيطر عليه، ومن ثم تمرر خلال فتحة صغيرة أمام خلية القياس واحدة بعد أخرى. يركز واحد أو أكثر من مصادر الضوء، نموذجياً أشعة ليزر، على مجرى الخلايا حيث تقوم وحدة الكشف بقياس الضوء المنبعث أو المتبعثر و/أو المتألق. يمكن تقدير صفات الخلايا الكاملة كالحجم والشكل كما يمكن تحديد مكونات خلوية مميزة. ويحتاج تحديد المكونات الخلوية إلى استخدام تقنيات تصبيغ خاصة يمكن إجراؤها في جهاز تحليل حقن السريان الذي يسبق جهاز قياس الخلايا السارية. من بين الأشياء التي يتم قياسها بهذه التقنية:

- حيوية الخلايا.
- الرقم الهيدروجيني داخل الخلايا (Intracellular pH).
- DNA.
- محتوى RNA.
- وبلازميدات معينة.

إلى جانب الأحماض النووية، يمكن تحليل مكونات خلوية داخلية أخرى مثل مواد الخزن والأنزيمات، والمحتوى البروتيني، مع تقييم سريع للحالة الفيزيولوجية. وباستخدام أجهزة أكثر تعقيداً، يمكن أداء التحاليل بعدة قنوات في آن واحد شريطة أن تكون الخلايا قد تم معاملتها بالشكل الصحيح.

5.10 السيطرة Control

إن الغرض الرئيسي من إجراءات السيطرة والتحكم على عمليات التقنية الحيوية هو الحفاظ على ثبات متغايرات معينة أو على مسار محدد مسبقاً. إنه الاستثناء وليس القاعدة أن توجد صيغة أو نموذج للعملية كافية لإجراء حسابات دقيقة، أي توقع، ومطابقة الحالات المتغايرة المفردة ذات العلاقة، مثل كتلة أو تركيز المواد الأولية، أو الكتلة الحيوية، أو الأنزيمات، أو النواتج التي تحقق الطلب تماماً كالإنتاجية الأعظمية أو النقاوة القصوى للمنتوج، أو تكوين أدنى كم من النواتج العرضية، أو تشكيلة من هذه المتغيرات. الحل العملي لهذه المشكلة هو تجزئة النظام المعقد إلى أنظمة ثانوية أصغر، ومحاولة إيجاد الظروف المثلى للأجزاء المنفردة. على سبيل المثال، تكوين أنظمة ثانوية بسيطة تخص ظروف التشغيل: مثل نمو الخلايا الذي سيكون بأقصى حالاته عند درجة حرارة و pH معينين (قيمة مفردة أو مدى صغير). وبهذا يمكننا عادة تنظيم هذه المتغايرات، التي يسهل مراقبتها ميدانياً بواسطة سيطرة الأنشوطة المغلقة (Closed-loop control).

من ناحية أخرى، هناك متغايرات مهمة أخرى في العملية يصعب مراقبتها أو أن تأثيرها في الظروف المثلى غير معروف بشكل دقيق. ففي هذه الحالات، تُطبِق الممارسات الصناعية سيطرة الأنشوطة المفتوحة وفق أنماط محددة مسبقاً. على سبيل المثال، يمكن أن يقود وتركيز الجلوكوز العالي إلى تكوين نواتج عرضية غير مرغوبة. أما إذا كان تركيزه قليلاً فإنه يسبب تحديدات غير مرغوبة وتدهور في أداء الخلايا ونموها. وحيث إن هذه القيم ليست ثوابت أساسية، فيجب تحديدها بالطرق التجريبية وبشكل منفرد. علماً، أنه حتى الطرق التحليلية والأجهزة العاملة في البيئات البحثية لا توفر في الحقيقة نتائج واضحة. عليه، وتحت ظروف الإنتاج، تشكل عملية المراقبة مشكلة كبيرة، كما أن تطبيق سيطرة الأنشوطة المغلقة لا يوفر نجاحاً دائماً. ولهذا، فإن الشخص يحاول أن يخمن ما يجب أن تكون عليه القيمة المثلى، أو أن يحدد النقطة المطلوبة حدسياً . في عمليات الدفعة المغذاة (Fed-batch) (أو العمليات المستمرة) فإن المتغاير الحاسم، في هذا المثال هو تركيز المادة الأولية، الذي يعتمد على عاملين مهمين على الأقل: معدل

الاستهلاك (الحجمي) والدفق إلى داخل وخارج النظام، وكما يعبر عنه بواسطة التوازن الكتلي (Mass balance):

$$\frac{d(SV)}{dt} = S_{in}F - r_S V \; (-SF) \qquad (7.10)$$

حيث تمثل (S) تركيز المادة الأولية، أي حالة التغاير التي لا يمكن مراقبتها بصورة روتينية؛ (V) هي حجم المعلق الحيوي (لا يكون ثابتاً في عمليات الدفعة المغذاة)؛ (S_{in}) هو تركيز المادة الأولية في المغذي (Feed)؛ و(F) هو المعدل الحجمي للمغذي؛ و(r_s) هو المعدل الحجمي لاستهلاك المادة الأولية.

إن الحفاظ على التركيز عند النقطة المحددة مسبقاً يعني أن القيمة التفاضلية لــ $\frac{ds}{dt}$ تصبح صفراً، وبالنسبة إلى العملية الدفعة المغذاة، فإن التوازن الكتلي يعطي الظرف التالي:

$$\frac{d(SV)}{dt} = S\frac{dV}{dt} + V\frac{dS}{dt} = S_{in}F - r_s V \qquad (8.10)$$

حيث تكون قيمة $\frac{dV}{dt}$ معروفة ومساوية لــ (F). إعادة ترتيب ووضع $o = \frac{ds}{dt}$، وتعريف $D = \frac{F}{V}$ يعطي:

$$\frac{ds}{dt} \equiv 0 = S_{in}\frac{F}{V} - r_s - S\frac{F}{V} = D\,(S_{in} - S) - r_s \qquad (9.10)$$

بمعنى آخر، فإن الدفق الداخل يجب أن يعوض الاستهلاك. وحسب أبسط الصيغ الحركية، فإن معدل الاستهلاك الحجمي يعتمد على تركيز المادة الأولية وعلى تركيز الكتلة الحيوية والمعدل الأقصى لمعدل الاستهلاك الخاص (q_{Smax}) الذي يفترض أن يكون معياراً ثابتاً (موجب)، في التقريب الأول:

$$r_S = q_{S\,max}\frac{S}{S + K_S}x \qquad (10.10)$$

إذا افترض أن معدل النمو الخاص (μ) يكون متناسباً مع المعدل الخاص لاستهلاك المادة الأولية فإن المسار الضروري لمعدل التغذية يمكن اشتقاقه:

$$F(t) = \frac{q_s}{S_{in} - S} x_0 V_0 e^{(\mu t)} \qquad (11.10)$$

حيث تمثل (X_0) تركيز الكتلة الحيوية و (V_O) حجم التشغيل في بداية خط التغذية، وعندما تكون القيمة العددية لــ (S) صغيرة جداً مقارنة بـــ (S_{in}) بحيث يمكن إهمالها. استغلت هذه الاعتبارات عن طريق اختزال المشكلة الصعبة للسيطرة على الحالة المتغيرة (S) إلى مشكلة أبسط كثيراً للسيطرة على المتغاير التشغيلي (F). يجري هذا عادة في نمط سيطرة الأنشوطة المفتوحة ، إلا أن سيطرة الأنشوطة المغلقة على (F) تكون سهلة عن طريق المراقبة الجذبية (التثاقلية) لخزان التغذية. مع ذلك، فإن أي تعريف متغير إضافي للسيطرة هو أمر صعب : ويجب على المرء أن لا ينسى الافتراضات العديدة التي افترضت أثناء اشتقاق مسار المغذي، كما يجب معرفة قيم المتغايرات X_o و V_o بدقة. ويكون الأمر سهلاً في حالة (V_0) ولكن ليس في حالة (X_o). كما يمكن تحسين هذه الحالة، التي تنطوي على مخاطرة، فقط إذا تم تصديق الافتراضات تجريبياً، أو عند توفر صيغ أو نماذج أفضل يمكن تطبيقها.

تطبق سيطرة الأنشوطة المغلقة عادة على المتغايرات التشغيلية الفيزيائية أو الكيميائية مثل درجة الحرارة والضغط والــ pH والدفق والأحجام، وفي بعض الأحيان على الضغط الجزئي للغازات، بالأخص (PO_2). ويمكن استخدام الانحراف (ε)، بين القيمة الحقيقية لمتغاير السيطرة والقيمة الموضوعة مسبقاً، للتأثير في العملية، بطريقة تؤدي إلى تقليل الانحراف إلى الحد الأدنى. ويجري هذا الشيء أوتوماتيكياً وليس يدوياً. وفي بعض الحالات، يكون كافياً استخدام السيطرات ثلاثية النقطة ذات المستوى المنخفض؛ على سبيل المثال، يمكن تشغيل صمام التبريد إذا تجاوزت درجة حرارة المعلق الحد الأعلى المسموح به، في حين ينشط صمام التسخين إذا تجاوزت حرارة المعلق الحد الأعلى المسموح به. ويتم تفعيل صمام التدفئة إذا تجاوزت الحرارة حدها الأدنى. في حالات أخرى، قد تتفاعل العملية بشكل غير مناسب لمثل هذا التغير البسيط للمتغايرات. وربما تبدأ متغايرات السيطرة

بالتأرجح حول النقطة المختارة وبسعة كبيرة. عندها، يجب أخذ ديناميكية العملية بالحسبان، ويستند المسيطر التفاضلي التكاملي المتناسب (Differential (PID) Controller Proportional Integral) الواسع الاستخدام إلى افتراض بسيط جداً حول ديناميكية العملية. يستجيب مسيطر (PID) لأي انحراف (ε) للمتغاير المقاس عن النقطة المختاره له بواسطة تغيير المتغاير المعالج (y) بالطريقة التالية:

$$y = y_0 + K_P\left(\varepsilon + \frac{1}{\tau_I}\int \varepsilon dt + \tau_D\frac{d\varepsilon}{dt}\right) \qquad (12.10)$$

إن المعايير الأربعة لهذا المسيطر، وهي: التحيّز (Y_o)، عامل التناسب أو الكسب (K_p)، والثابتان الوثيقان للتكاملي (Integral) والمشتق (Derivative)، τ_1 و τ_D، يجب أن يحددا بواسطة تجارب بسيطة. وسيكون هذا الأمر سهلاً ما دامت ديناميكة العملية ثابتة.

في أسهل الحالات، فإن طريقتي زيغلر (Ziegler)، ونيكولز (Nicols) مفيدتان. وفي نمط متناسب خالص، يزداد الكسب باستمرار حتى يبدأ متغاير السيطرة بالتأرجح بشكل ثابت. إن الكسب الحرج Critical gain (Kp, crit) والفترة الزمنية للتأرجح (t_{crit}) تستخدم لتحديد المعايير المدرجة في الجدول 1.10.

في التطبيقات الأكثر شيوعاً، يجب تحديث معايير المسيطرات باستمرار. في السيطرة التكيفية (Adaptive control)، تتغير المعايير حسب مؤشر الديناميكيات العملية. إن هذا قد يكون متغايراً مقاساً بشكل مستقل، وفي المحاولة الأولى يجري توليف معايير المسيطر حسب علاقة خطية لإشارة المؤشر. وتشير الخبرة، على سبيل المثال، إلى أن معدل أخذ الأكسجين هو انعكاس جيد لديناميكية العملية. يمكن تحديد قيمة هذا المتغير ببساطة واستخدامها لتحديث معايير المسيطر على معدل النمو الخاص باستمرار من خلال زيادة (Kp) وتقليل (τ_1) و (τ_D) بشكل متناسب. يقود هذا عادة، إلى تحسن كبير في أداء المسيطر ولفترة زمنية طويلة، أو حتى لكامل وقت العملية.

فإذا لم تنجح هذه الطريقة البسيطة، عندها نحتاج إلى استعمال صيغ أو نماذج جديدة. ويستخدم في صيغ التحكم المخمنة توقع في السيطرة على قيم المتغايرات التي يراد السيطرة عليها. واعتماداً على هذه التوقعات، يمكن للشخص أن يحاكي (Simulate) تفاعل العملية لتحقيق تغير مقصود لمتغاير معين. ومن مجموعة من هذه التغيرات، ينتقي المسيطر الأفضل، ويقوم بالتغيير تبعاً لذلك. يكون كافياً أن تقوم بالتوقع لفترات زمنية مستقبلية محددة، وهذا يسمى بالأفق الزمني (Time horizon)، الذي يجب تحديثه باستمرار.

الجدول 1.10: انتقاء المعايير [أ] المفيدة للمسيطر التفاضلي التكاملي المتناسب وحسب طريقة زيغلر ونيكولاس

K_P	τ_I	τ_D	طريقة التحكم المرغوبة
$0.5K_{P,crit}$	—	—	P
$0.45K_{P,crit}$	$0.85t_{crit}$	—	PI
$0.6K_{P,crit}$	$0.5t_{crit}$	$0.125t_{crit}$	PID

(أ) تعتمد هذه الطريقة على الخبرة العملية وتحتاج إلى عدة تجارب بسيطة (ولكن واعدة!) تكون فيها العملية تحت سيطرة متناسبة ومطلقة مع طريقة الأنشوطة المغلقة، أي، مع غلق الأجزاء التكاملية والتفاضلية، بحيث يزداد كسب المسيطر بصوره مستمرة حتى تصبح العملية غير مستقرة. (أي، تبدأ متغايرات السيطرة بالتأرجح). تحسب قيم المعايير المطلوبة من قيمة الكسب الحرج وفترة التأرجح.

6.10 الاستنتاجات Conclusions

إن التقدم في سيرورة التقنية الحيوية يدفعه ظهور المشاكل. ومن هذه المشاكل ما يدعو إلى تصميم عملية حيوية جديدة بأقل وقت ممكن، أو إيجاد وتوفير الظروف المثلى لعملية موجودة فعلاً، وذلك للحصول على أقصى كفاءة، ولتكرار تشغيل عمليات حيوية مصدقة والحصول على منتوج عالي النوعية. يتم توفير المعلومات الضرورية عن طريق القياس والمراقبة، ولكن هذا ليس كافياً. فالنجاح

يتطلب فهماً عميقاً وكافياً للمبادئ الحيوية والهندسية ولجميع العوامل المؤثرة الأخرى. يمكن الحصول على الكثير من هذه المعرفة من المصادر النظرية، ولكن يعتمد الكثير منها على الخبرة العملية. وتحتاج هذه الخبرة إلى أن تحول إلى أفعال ذكية وسليمة تجبر العملية على الاتجاه بالوجهة الصحيحة. التصييغ (النمذجة) والسيطرة هي أكثر الأدوات أهمية في الوصول إلى هذا الهدف.

7.10 قراءات إضافية Further reading

BellonMaurel, W., O. Orliac, and P. Christen, "Sensors and Measurements in Solid State Fermentation: A Review." *Process Biochemistry,* vol. 38 (2003), pp. 881-896.

Buziol, S., I. Bashir and A. Baumeister [et al.]. "New Bioreactor-coupled Rapid Stopped-flow Sampling Technique for Measurements of Metabolite Dynamics on a Subsecond Time Scale." *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 80 (2002), pp. 632-636.

Feyo de Azevedo, S., R. Oliveira and B. Sonnleitner, "New Methodologies for Multiphase Bioreactors. 3: Data Acquisition, Modelling and Control." in: J. Cabral, M. Mota and H. Tramper, eds., *Multiphase Bioreactor Design.* London: Taylor and Francis, 2001, pp. 53-84.

Harms, P., Y. Kostov, and G. Rao, "Bioprocess Monitoring." *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 13 (2002), pp. 124-127.

Komives, C. and R. S. Parker, "Bioreactor State Estimation and Control." *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14 (2003), pp. 468-474.

Lennox, B., G. A. Montague, H. G. Hiden, G. Kornfeld, P. R. Goulding, "Process Monitoring of an Industrial Fed-Batch Fermentation." *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 74 (2001), pp. 125-135.

McGovern, A. C., D. Broadhurst, and J. Taylor [et al.], "Monitoring of Complex Industrial Bioprocesses for Metabolite Concentrations Using Modern Spectroscopies and Machine Learning: Application to

Gibberellic Acid Production.” *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 78 (2002), pp. 527-538.

Schaefer, U., W. Boos, R. Takors, and D. WeusterBotz, “Automated Sampling Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics.” *Analytical Biochemistry,* vol. 270 (1999), pp. 88-96.

Schügerl, K. “Progress in Monitoring, Modeling and Control of Bioprocesses during the Last 20 Years.” *Journal of Biotechnology,* vol. 85 (2001), pp. 149-173.

Sonnleitner, B. (ed.) *Bioanalysis and Biosensors for Bioprocess Monitoring. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 66. Berlin: Springer-Verlag, 2000.

Ulber, R., R. Faurie, and P. Sosnitza [et al.], “Monitoring and Control of Industrial Downstream Processing of Sugar Beet Molasses.” *Journal of Chromatography A,* vol. 882 (2000), pp. 329-334.

الفصل الحادي عشر

اقتصاديات العملية

Process Economics

بيورن كريستيانس **Bjorn Kristiansin**

Eu لاستشارات التقنية الحيوية، النرويج **Eu Biotech Consulting, Norway**

1.11 المقدمة Introduction

يتطرق هذا الفصل إلى الأشياء المتعلقة باقتصاديات العملية من وجهة النظر العملانية، ويهتم بالعوامل التي تساهم بدفعها بدءاً من قسم الهندسة إلى جميع المرافق الأخرى التي يحتاجها مهندسو العملية لضمان عملية مربحة. لعل نقطة البداية هنا تتمحور حول ما يلي: كم سيكلف إنتاج (س) من الأطنان سنوياً من منتوج عملت عليه منذ البداية لغاية وصولك إلى مرحلة إنتاج ريادي ناجحة؟ وكم من المال يمكن أن تدّر هذه العملية في حالة توسيعها إلى سيرورة صناعية؟ ولعل ذلك يبدو شيئاً كبيراً، ولكنه في الحقيقة ليس كذلك. فسوف تجد أنه من السهل أن تحصل على تقدير معقول لاقتصاديات العملية التي تنوي القيام بها، وأي عمليات أخرى، حالما تعرف ما هي الأدوات التي يتوجب استعمالها. وما هو نوع وحجم العملية التي تتكلم عليها؟ ولأجل توضيح اقتصاديات أية عملية، علينا من حيث المبدأ انتقاء إحداها. وعليه، فإذا كان هذا الفصل لا يتطرق إلى عملية تخصك بالذات فالرجاء أن لا تيأس، فنحن نتعامل مع المبادئ، ومبادئ الاقتصاد ليست متخصصة بعملية معينة فقط.

دعنا نتطرق إلى منتوج مألوف لنا جميعاً: الجيمفرلين (Gemferlin) مثلاً، وهو منتوج للرعاية الصحية يستخدم في علاج السمنة. ماذا يعمل الجيمفرلين، وممّ يتكّون؟ ليس من اهتمامنا. فبالنسبة إلينا، يكفينا أن نعلم وحسب ما أوضحه لنا العاملون في مختبرنا أن بالإمكان إنتاجه بصورة آمنة، وأن جميع الوثائق المصدقة وذات العلاقة به موجودة. الأهم من ذلك أن المسوقين (Marketing people) يؤكدون لنا إمكانية بيع (س) من أطنان هذا المنتوج سنوياً إذا كان سعر البيع مساوياً لــ (ص). الحقيقة الأخرى التي يجب أن لا تقلقنا كثيراً، حالياً في الأقل، هي أن شركة Amtrenger المنافسة تنتج هذه المادة منذ عدة سنين، ولكن مدة براءة اختراعهم قد انتهت، وقد طورنا نحن طريقة أفضل بكثير من طريقتهم غير الكفوءة. إذن، ما يجب أن نركز عليه الآن هو تحديد إذا كان بإمكاننا إنتاج (س) من الأطنان وبسعر إنتاجي يقود إلى بيعه بسعر (ص) أو أقل من ذلك. من الطبيعي أن نكون مهتمين كذلك بإنتاج كميات تفوق الرقم المطلوب، وهذا سيسعد المستثمرين في العملية. من ناحية أخرى أشارت تحقيقاتنا الأولية إلى أن الجيمفرلين :

- ليس له أعراض جانبية معروفة،
- يمكن لجسم الإنسان أن يتحمل الجرعات الزائدة منه،
- يمكن أن تضاف له نكهة،
- له سوق رائجة وهو لا يزال ينمو بسرعة،
- التقنية التي تستخدمها في الإنتاج أفضل من غيرها،
- يذوب بسرعة في السوائل القطبية واللاقطبية،

وعليه فإن أهدافنا تحددت في:

(أ) أن نصمم مصنعاً لإنتاج الجيمفرلين.

(ب) أن نقدر رأس المال وتكاليف التشغيل للمصنع.

(ج) أن نبين أن كلفة الإنتاج ستقود إلى سعر بيع منافس.

1.1.11 من أين نبدأ؟ Where to start?

للحصول على المنتوج وبمعدل إنتاج سنوي مرغوب سيتبادر إلى ذهنك العديد من الأسئلة حالما تبدأ العمل على الأهداف المطلوبة، مثل:

- ما هي المواد الأولية المطلوبة؟
- من أين يمكن الحصول عليها؟
- ما هو الحجم والمساحة المطلوبين لاحتواء الأجهزة اللازمة للعملية؟
- هل تحتاج إلى مصنع جديد أم يمكنك استعمال مصنع موجود؟
- ما مقدار رأس مال الاستثمار المطلوب؟
- كم ستكون كلفة التصنيع؟
- ما هو حجم الدفعة (Batch) الإنتاجية الأمثل؟
- هل تحتاج إلى موافقات تنظيمية؟
- ما هي الكمية التي يجب إنتاجها؟
- هل ستكون جميع عوامل الإنتاج بنظام الدفعة، أم أن عدداً منها سيكون بالنظام المستمر؟
- ما هي خطوات العملية أو الموارد التي تمثل عنق الزجاجة؟
- ما هو تأثير العملية في البيئة (أي، كمية ونوعية الفضلات الناتجة)؟
- هل بإمكانك الحصول على الكادر المطلوب؟

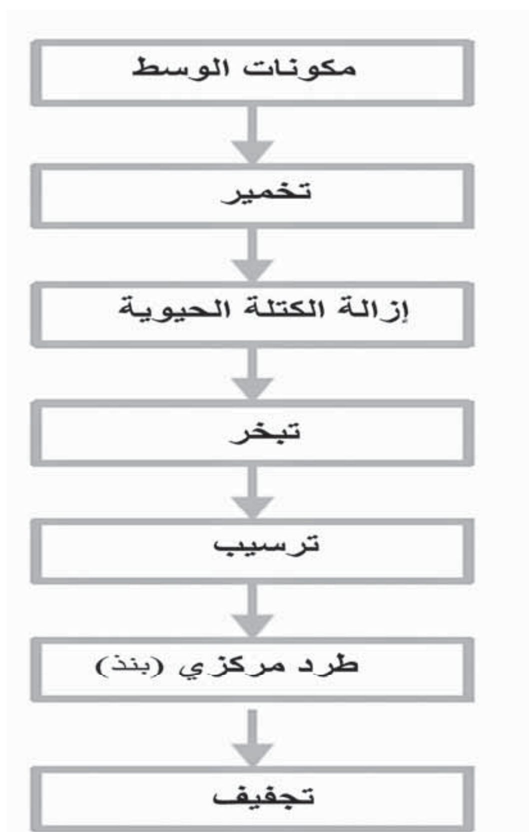
لا يمكن استثناء أيٍّ من هذه الأسئلة، وبالتالي ليس لك خيار آخر غير الحصول على أجوبة لجميعها. علماً، أن الطريقة المثلى لمعالجة هذه الأسئلة هي إجابة كل سؤال على حدة. إن أهم معيار في التصميم هو: ما هي كمية الجيمفرلين التي سنقوم بإنتاجها؟ حالما عرفنا جواب هذا السؤال، سنتمكن من إجابة بقية الأسئلة، وأيّة أسئلة إضافية أخرى.

يتحدد مستوى الإنتاج عادة باعتبارات السوق. أي، ما هي الكمية التي تخطط لبيعها؟ ولأغراض تحددها أهداف هذا الفصل سنفترض أن قسم التسويق

جاء برقم وهو 252 kg من الجيمفرلين سنوياً، مستنداً في ذلك إلى التحليلات العملية للسوق وإلى أعمال التحريات.

2.11 عملية الإنتاج الكلية Overall production process

ينتج الجيمفرلين بواسطة سلالة محورة من *Alternaria* التي تزرع في وسط مناسب لإنتاج المادة المرغوبة. تزال بعدها الكتلة الحيوية ويتم التخلص منها. ثم يؤخذ السائل الناتج الذي يحتوي على المنتوج الخلوي، ويعالج لغرض عزله وتنقيته. وكما أشير له في الفصل التاسع، فإن أساس هذه العملية هو إزالة كميات من الماء كبيرة للحصول على جزئية صغيرة نسبياً وبتراكيز منخفضة. ويوضح الشكل (1.11) مخططاً لكامل العملية.



الشكل 1.11: مخطط عملية إنتاج الجيمفرلين.

الإطار 1.11

يوضح الشكل (1.11) العمليات التي يجب إجراؤها وهو ليس بمخطط إنتاجي للمصنع. ستكون هناك حاجة إلى خزانات حفظ (Holding tanks) في المراحل المختلفة لضمان الاستعمال الأفضل للأجهزة. على سبيل المثال، إن مخمر الإنتاج الذي يشكل المرحلة الأطول يجب تفريغه بأسرع زمن ممكن لتقليل زمن الدورة (Turnaround time). وبهذا، فإن المرق يضخ إلى خزان حفظ قبل البدء بعملية إزالة الكتلة الحيوية. لاحظ كذلك أن الوحدات المشتركة في العملية قد اختيرت لكي توضح عملية معالجة معينة مطلوبة. وبهذا فإن النبذ المركزي قد يستبدل بعملية الترشيح، وقد تستخدم عدة خزانات حفظ وسطية، وعدة خطوات تنقية للحصول على منتوج نقي. علماً، أن الشركات المتخصصة التي تعمل على المعالجات الأخيرة قبل التسويق غالباً ما تجري عملية التنقية الأخيرة للمنتوج.

3.11 خطوات التخمير Fermentation steps

1.3.11 تحديد حجم المخمرات Sizing of fermenters

سنفترض أن العملية تم توسيعها بنجاح (تأكد من أن هذا الافتراض صحيح عندما تقوم بإجراء هذه العملية بالواقع الحقيقي حيث إن التقنية الحيوية مصممة بشكل خاص من أجل مشاكل التوسيع). تستخدم العملية وسط زرعي صناعي (Synthetic medium)، وبهذا سوف نتجنب استعمال المواد الخام المعقدة التي قد تسبب لنا مشاكل في معالجات أسفل المجرى وفي المصادقة على طرائق العمل.

لا توجد حاجة إلى ماء نقي من نوع خاص لعملية التخمير: إن ماء الحنفية سيكون مناسباً للاستعمال. أظهرت الفحوصات أن تركيز الجيمفرلين المطلوب هي 252 kg في السنة. وأن تركيزه في نهاية عملية التخمير هو $0.3\ kg/m^3$ طبعاً سيكون هناك فقدان للمنتج في مراحل الفصل والتنقية. فإذا افترضنا خسارة

مقدارها 10 ٪ (وهو الفقدان القياسي للعملية التي نجربها) فسوف نحتاج إلى إنتاج حوالى 280 كغم في السنة. وبهذا فإن السعة التخميرية الكلية التي نحتاجها ستكون $1244\ m^3$ مع الافتراض أن نسبة الأشغال للمخمر هي 75% (أي أن الحجم العامل هو 75% من الحجم الكلي للمخمر).

نحن نعرف أن كلفة المفاعل تتناسب مع $(\text{الحجم})^{0.7-0.6}$، وبهذا، كلما كبر الحجم كانت كلفة إنتاج الوحدة أقل. علماً بأننا إذا اخترنا حجماً قياسياً للمفاعل يبلغ $250\ m^3$ فإنه سيستخدم خمس مرات في السنة، ما لم نستغله لعمليات أخرى فإن هذا المخمر سيبقى فارغاً لمعظم أيام السنة، ويعد هذا أمراً مكلفاً. وعليه، فسوف تختار حجماً تخميرياً يضمن استعمال المخمر لأكثر من شهرين. ولهذا سنبدأ باختيار مفاعل يبلغ حجمه $25\ m^3$. فإن هذا الحجم مناسب لزرع فطر الـ *Alternaria* من ناحيتي الكلفة والمعالجة. إضافة إلى ذلك فإن هذا المخمر سيكون كبيراً بما فيه الكفاية لاستخدامه في مشاريع أخرى إذا احتجنا، أو أردنا، كاستخدامه كموقع منظمة تصنيع بالعقود (CMO-Contract manufacturing organization) وإذا سمحنا بزيادة حجم بعض معالجات أسفل المجرى، عندها يمكننا زيادة السعة الكلية للمصنع من خلال إنشاء مخمرات جديدة فقط.



الشكل 2.11: مراحل التخمير.

وباستخدام حجم لقاح (Inoculum) يبلغ 10%، فإن قطار التخمير سيحتوي على الخطوات الموضحة بالشكل (2.11).

الإطار 2.11

لاحظ أنه ليس من الضروري أن تتبع مراحل التخمير عامل التوسع التقليدي (10). وبالإمكان أن يصبح قطار التخمير البديل كالآتي:

دورق هزاز--- مخمرة 50 لتر --- مخمرة $1m^3$ --- مخمرة $25\ m^3$.

قد يؤدي هذا إلى اختزال تكاليف رأس المال وتكاليف التشغيل. ولأجل أن يعمل هذا المخطط فإنه من الضروري جداً أن تكون على معرفة جيدة جداً بالعملية، وذلك لأن العديد من عمليات التخمير تكون حساسة لمستوى منخفض من اللقاح (Low inoculums level).

2.3.11 زمن التخمير Fermentation time

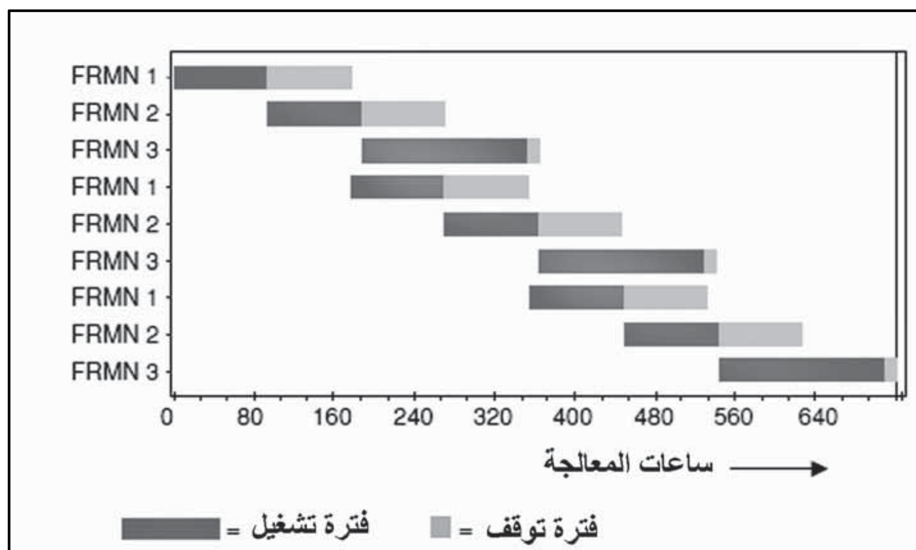
غالباً ما تستخدم المعادلة التالية لحساب زمن التخمير (انظر الفصل السادس)

$$\ln x_f/x_o = \mu t$$

تمثل x_f تركيز الكتلة الحيوية النهائي (kg/m^3)، x_o التركيز الأولي للكتلة الحيوية (kg/m3)، و μ معدل النمو الخاص (بالساعة) و t زمن التخمير (ساعة).

نحن نعرف ومن خلال تجاربنا بالمصنع الريادي أن التركيز النهائي للكتلة الحيوية سيكون $20\ kg/\ m^3$، وبما أننا نستخدم نسبة لقاح (Inoculum) قياسية، وهي 10%، فإن التركيز الأولي للكتلة الحيوية سيكون هو $2\ kg/\ m^3$. المشكلة الآن تكمن في إيجاد قيمة معدل النمو النوعي. فالمعادلة أعلاه تكون صالحة فقط عندما تكون الخلايا نامية تنمو في طورها الآسي (Exponentially) بصورة دائمة، وهو شيء لا يحدث باستمرار في عمليات التخمير الموسعة التي تدوم لعدة أيام، وبالأخص لا يحدث للفطريات الخيطية مثل الــ Alternaria. على الرغم من أن الطريقة الأكاديمية في معرفة زمن التخمير هي طريقة شيقة، إلا أننا، وفي الغالب، نعتمد الخبرة في تحديد زمن التخمير.

لقد أظهرت اختباراتنا في المصنع الريادي الحاجة إلى ستة أيام لكي تصل عملية التخمير إلى منتهاها، ونحن نعتمد هذا الزمن للتخمير في مراحل المفاعل أثناء عملية إنتاج معينة. أما بالنسبة إلى مراحل المفاعل حيث نريد الكتلة الحيوية أن تنمو فقط، فقد نستعمل عدداً أقل من الأيام.



الشكل 3.11: جدولة المخمر موضحة في مخطط جانت (Gantt chart) حيث إن المخمر رقم 1 بحجم 250 لتراً، والمخمر رقم 2 بحجم 2.5 m3، والمخمر رقم 3 هو مخمر الإنتاج. (المخمر الصغير ذو حجم 25 لتراً لم يشمل بهذا المخطط).

3.3.11 الجدولة Scheduling

يصنع المنتوج في حوض الإنتاج فقط، أما الأحواض الأصغر فتستخدم لإنتاج كتلة حيوية كافية لتوفير لقاح ناجح. في حالتنا نحن، يعمل المخمر الأصغر لمدة أربعة أيام ليصل إلى تركيز الكتلة الحيوية الملائم قبل أن تنقل محتويات المفاعل إلى خزان أكبر. وبهذا سيأخذ كل من المراحل الثلاث الأولى أربعة أيام، وستستغرق مرحلة الإنتاج ستة أيام مع يوم واحد لإعادة الدورة (Turnaround). إن جدولة المخمرات التي تضمن استخدام خزان الإنتاج بأعلى كفاءة موضحة بالشكل (3.11).

الإطار 3.11

يوضح الشكل (3.11) كيفية تشغيل المخمر الأصغر لضمان الحصول على لقاح جديد يكون جاهزاً للاستعمال في مخمر الإنتاج حالما يتم إفراغه ويصبح خالياً ونظيفاً من الوجبة السابقة. يظهر الشكل كذلك زمن ما قبل التشغيل (Downtime) الكبير نسبياً للمخمرات الأصغر.

من الواضح أن هناك مجالاً لإعادة تصميم المصنع لجعله أكثر كفاءة في استخدام المخمرات. يمكن أن يشمل هذا استعمال المخمر الأصغر لتلقيح خزانات إنتاج أكثر أو اختزال عدد مراحل التلقيح، كما هو مقترح في الجزء (1.3.11).

4.3.11 تكاليف وحدات عمليات التخمير
Costs for fermentation processing

تحسب تكاليف المخمرات ووحدات العمليات الأخرى تقليدياً باستخدام الفهارس المنشورة (Published indices). فإن فهرس الكلفة (Cost index) هو وسيلة لربط الكلفة الحالية بكلفة الماضي. على سبيل المثال، فإن فهارس الكلفة لمصنع الهندسة الكيميائية لعامي 1986 و 2001 هي 318.4 و 394.3 على التوالي، وإذا علمت أن تكاليف المخمر هي 500,000 دولار أمريكي في عام 1986، فإنها ستكلف 619200 في عام 2001. يمكنك، وباستخدام فهارس الكلفة المنشورة في الأدبيات العلمية، أن تقدر التكاليف في الزمن الحالي، كما يمكنك أن تستنبط (Extrapolate) أسعار الزمن الحاضر. طبعاً، إن فهارس التكاليف تمثل معدلات الأرقام فقط، ولكنها تستخدم وبنجاح لفترة طويلة وسيستمر استخدامها. علماً، أن هناك شركات متخصصة في أجهزة المعالجة لعمليات التقنية الحيوية، ويكون من الأسهل كثيراً الاتصال بهم مباشرة. وعندما يكونون مستعدين لاقتراح سعر معين للجهاز الذي تريده، يمكنك أن تقارن سعرهم بالأرقام المتوفرة على الشبكة العنكبوتية (Internet) وسوف تحصل على تقدير جيد جداً للكلفة. إن المخمرات التي سنستخدمها هي من نوع الخزان المخفوق (STF). وتكون هذه

المخمرات غالية نسبياً من ناحيتي تكاليف رأس المال وتكاليف التشغيل، ولكنها ربما تكون الأفضل بالنسبة إلى عملية التخمير التي تجريها. إن أحجام وكلفة المخمرات المختلفة والأجهزة المرتبطة بها موضحة بالجدول 1.11.

الجدول 11.1: أحجام المخمر وكلفة الشراء

الوحدة	الحجم (m^3)	الكلفة (1000 × يورو)
ضاغطة هواء (Air compressor)		61
خزان تحضير الوسط (Medium make-up tank)	10	65
خزان الحفظ للسكر (Holding tank for suger)	150	51
معقم مستمر (Contineous steriliser		205
لقاح 1 (Seed 1)	250(*)	60
لقاح 2 (Seed 2)	2	203
إنتاج	25	687
المجموع الكلي		1332

(*) حجم المخمر للقاح 1 مقاس باللترات.

الإطار 4.11

الأسعار الموضحة في الجدول (1.11) هي كلفة خارج المصنع ex-factory وتساوي السعر الذي تدفعه للحصول على الجهاز خارج باب المصنع للخزان والخفاق. وإن نصب وتركيب الأجهزة والعمليات الهندسية المرتبطة بها هي تكاليف إضافية. لاحظ كذلك بأنهم يشيرون إلى مخمر أساسي (Basic) مجهز بأقل متطلبات الاحتواء (Containment). إذا كانت سلالة *(Alternaria)* التي نستعملها محوره وراثياً فسوف نحتاج إلى مستوى أعلى من الاحتواء وأن الزيادة في المواصفات التصميمية ستجعل من وحدة المعالجة أكثر

4.11 خطوات المعالجة أسفل المجرى

Downstream processing steps

خزانات الحفظ (Holding tanks): يمكن أن تذهب مكونات المخمر مباشرة إلى المرحلة الأولى من معالجات أسفل المجرى. علماً أننا نريد إفراغ مخمر الإنتاج بأسرع ما يمكن لجعله جاهزاً لاستقبال الوجبة التالية، لأن مرحلة التخمير هذه هي العملية التي تأخذ الزمن الأطول. تكون مراحل المعالجة أسفل المجرى أسرع دائماً، ولهذا فنحن ندفع بمحتويات المخمر مباشرة إلى خزان الحفظ. وبما أن مدة التخمير هي ستة أيام، ففي هذه الحالة سيكون كافياً لخزان الحفظ استيعاب محتوى مخمر إنتاج واحد. أما بالنسبة إلى عمليات التخمير الأسرع، فإن خزان الحفظ قد يكون كافياً لاستيعاب عدة أحجام من محتوى مخمر الإنتاج.

- إزالة الكتلة الحيوية (Removal of biomasses): تبدأ معالجات أسفل المجرى بإزالة الكتلة الحيوية. في حالتنا اخترنا إجراء هذه العملية باستخدام مرشح الأسطوانة المفرغة (Rotary vacuum filter) (انظر الفصل التاسع). إن هذه التقنية معروفة ومثبتة بشكل جيد وقد تكون هي الطريقة المثلى لإزالة الكتل الحيوية الخيطية.
- تركيز الراشح (Concentration of filterate): للحصول على المنتوج، وهو عبارة عن معقد جلايكوبروتيني، من سائل التخمير، فإننا نرسبه باستعمال مذيب. ولتجنب استخدام كمية كبيرة من المذيب علينا إزالة ما أمكن من الماء قبل مرحلة الترسيب. وبما أن منتوجنا هو غير حساس للحرارة فسنقوم بإزالة الماء بالتبخير.
- ترسيب المنتوج (Product precipitation): بعد اختزال حجم سائل التخمير بحوالى 80-90%، نضيف المذيب الذي يعمل على ترسيب المنتوج. بإمكاننا أيضاً استخدام الأملاح، خاصة أملاح الأمونيوم، لعملية الترسيب.

- إزالة الراسب (Removing the precipitate): بعد مرور زمن قصير على عملية الترسيب، نركز المنتوج باستخدام النبذ المركزي. ينتج من ذلك منتوج طيني القوام يتوجب غسله بشكل جيد.
- الغسل (Washing): يغسل المنتوج الطيني القوام مرتين، مرة باستخدام المذيب الذي استخدم بعملية الترسيب، والمرة الثانية باستخدام الماء. يتم إجراء ذلك بإضافة مذيب وماء إلى المنتوج الطيني وإخضاع المحلول الناتج الحاوي إلى المنتوج عالقاً فيه إلى النبذ المركزي.
- التجفيف (Drying): تجفف عجينة المنتوج بعد الغسلة الثانية. في حالتنا، اخترنا مجففاً رشاشاً، ولكن هناك أنواع مختلفة من المجففات التي يمكن استعمالها، حسب كمية الماء المطلوب إزالته والاستقرار الحراري للمنتوج.
- التعليب والتغليف (Packaging): يغلف المنتوج بعد تجفيفه في حاويات ملائمة ويكون جاهزاً للشحن.

معالجات أسفل المجرى موضحة بالشكل 4.11.

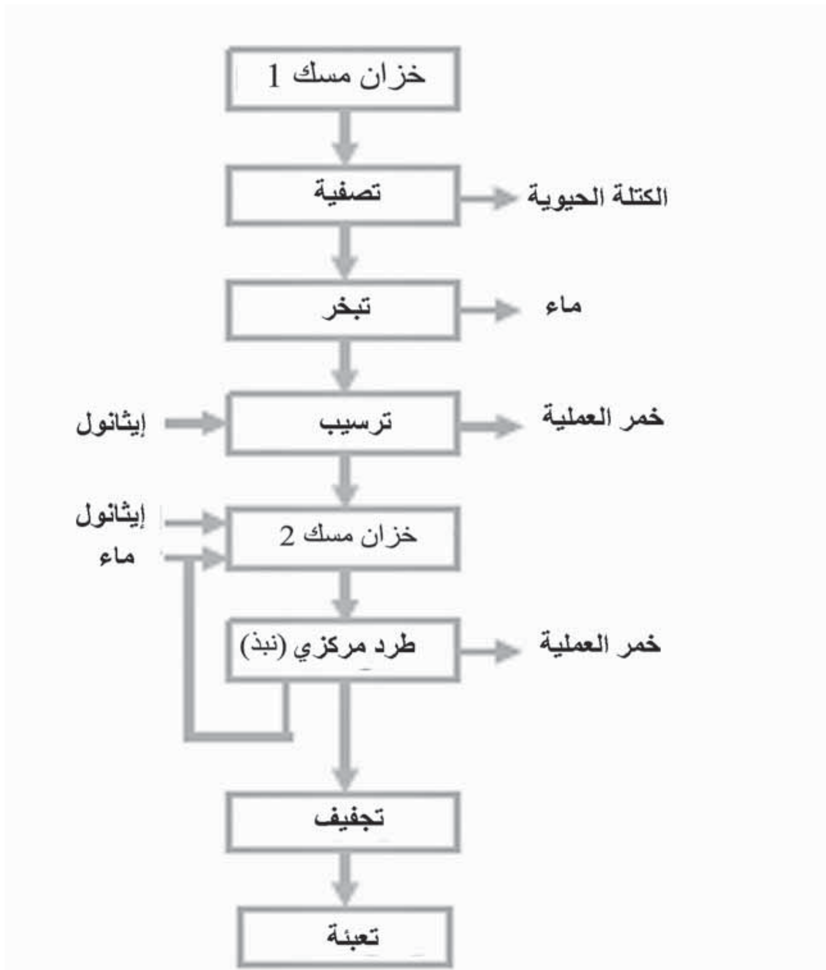
الإطار 5.11

قد يكون استرجاع المذيب جزءاً مهماً من العملية، ولكنه غير مشمول هنا. لاحظ كذلك سيكون هناك خطوات معالجة بديلة من شأنها تحسين كفاءة وكلفة العملية. غالباً ما يستخدم الترشيح الفائق لاسترجاع البروتينات، ويمكن استبدال خطوة مرشح الأسطوانة المفرغة بخطوة النبذ المركزي. إضافة إلى ذلك، من الممكن أيضاً استرجاع المنتوجات الخارج خلوية، مثل الجيمفرلين، بدون الحاجة إلى إزالة الكتلة الحيوية عن طريق عملية تسمى استرجاع المرق الكلي (Whole broth recovery). وفي هذه الحالة نذهب مباشرة من خزان الحفظ إلى عملية الاسترجاع.

1.4.11 كلفة وحدات معالجات أسفل المجرى

Cost of downstream processing units

كلفة الوحدات المستخدمة في معالجات أسفل المجرى لمرق تخمير الفطريات موضحة بالجدول 2.11. جميع الوحدات هي أجهزة تقليدية، ويجب أن لا ينظر إليها كوحدات معالجة مثلى لمعالجات أسفل المجرى.



الشكل 4.11: معالجات أسفل المجرى لمرق التخمير.

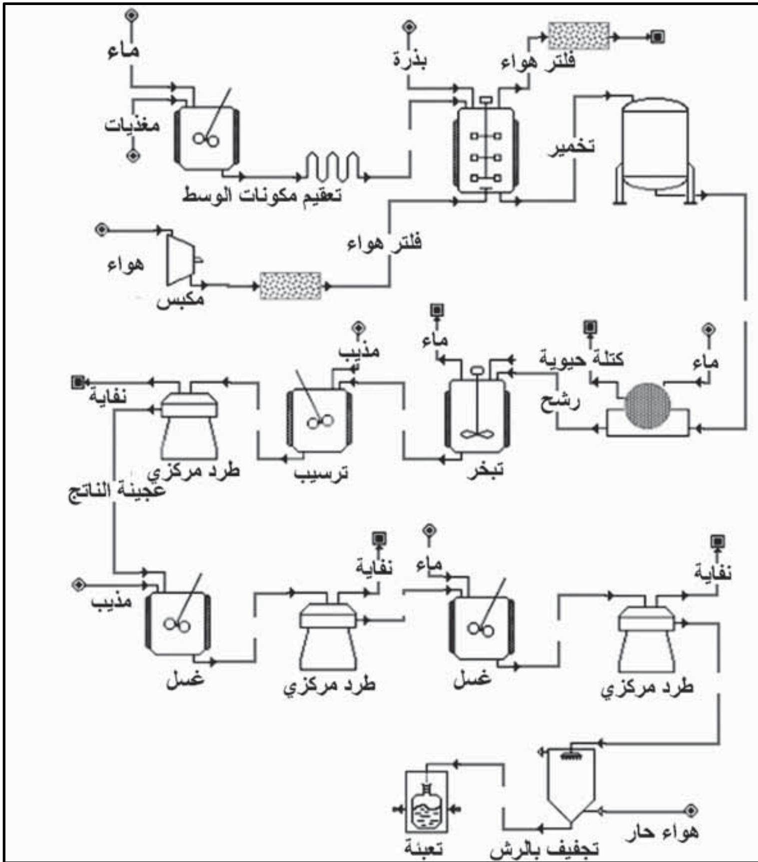
الجدول 2.11: تكاليف الشراء لوحدات المعالجة أسفل المجرى	
الوحدة	**كلفة الشراء من المصنع (100 × يورو)**
مرشح دوار مفرغ (RVF)	170
مبخر	82
خزان حفظ $25\ m^3$	36
خزان حفظ $10\ m^3$	22
جهاز نبذ مركزي (عدد 2)	156
مجفف	64
المجموع الكلي	350

الجدول 3.11 كلفة استثمار المصنع		
الفقرة	**عامل التضاعف**	**الكلفة (1000×يورو)**
كلفة شراء الأجهزة (EPC)		1862
التركيب	EPC x 0.3	535
المواسير	EPC x 0.5	892
ضبط الأجهزة	EPC x 0.3	535
أعمال بناء	EPC x 0.3	535
تحسين القاعة	EPC x 0.1	178
شراء الأرض	سعر مفترض	25
أجور وإجازات (شهادات)	EPC x 0.04	71
تخطيط	EPC x 0.25	446
إدارة الموقع	EPC x 0.05	89
البدء	EPC x 0.07	125
طوارىء	EPC x 0.4	714
رأس مال العمل	EPC x 0.3	535
المجموع الكلي الثابت لرأس المال		6464

5.11 تكاليف رأس المال Capital cost

مخطط المصنع موضح بالشكل 5.11.

لاحظ أن الشكل 5.11 هو مخطط لعمليات المعالجة. يمكن إجراء جميع عمليات الغسل والنبذ المركزي في نفس الوحدات باستخدام أحجام متشابهة من المذيب وماء الغسل. علماً، أنه عند استخدام أجهزة النبذ المركزي فمن الشائع جداً وجود جهاز احتياطي، وبهذا سيحتوي مصنعنا على جهازين للنبذ المركزي. لتقدير الاستثمار الكلي للمصنع فإنه شائع ربط هذه الكلفة بكلفة شراء وحدات المعالجة الأساسية التي تم توضيحها في الجزأين 5.3.11 و 1.4.11. والحسابات المطلوبة لتقدير قيمة استثمار رأس المال المطلوب موضحة أدناه بالجدول 3.11.



الشكل 5.11: خطوات المعالجة لمصنع التخمير (انتج المخطط باستخدام Superpro Designer, Intelligen, Inc. USA وبموافقتهم).

الإطار 6.11

تعتمد الكلفة المقدرة في الجدول 3.11 بشكل كبير على قيمة عوامل التضاعف (Multiplication factor). بالرغم من أن قيم عوامل التضاعف في الجدول مقدمة كقيم ثابتة، إلا أنها ضمن أمداء معينة. تستند هذه القيمة إلى أرقام حقيقية أخذت معدلاتها. إن القيمة التي يجب اختبارها تتأثر بنوع وحجم المصنع وموقعه. على سبيل المثال، إذا كان مستوى الاحتواء المطلوب عالياً جداً، فإن قيمة المضاعف (Multiplier) للأجهزة قد يصل إلى 0.8. وبهذا عند البحث عن قيم عوامل التضاعف في الأدبيات العلمية يكون من الضروري أن نأخذ بالحسبان النواحي التي تؤثر في مقدار أو قيم العوامل.

6.11 كلف التشغيل Operating costs

الخطوة اللاحقة هي معرفة كلفة تشغيل المصنع. يشمل هذا كلفة جميع المواد الكيميائية، واستخدام البخار والماء والكهرباء، وكلفة الكوادر، والتأمين، والإدامة، والفائدة على القرض الذي أخذته لشراء الأجهزة... إلخ. من الممكن حساب الفقرات المختلفة بصورة منفردة ثم جمعها معاً، إلا أن هذه العملية تتطلب جهداً كبيراً، وأن الأبسط هو استعمال محاكيات المعالجة (Process stimulators). وهذه عبارة عن برامج كومبيوتر توفر تقديرات الكلفة. توجد كذلك برامج تساعد في تصميم وتشغيل المصنع (انظر جزء قراءات إضافية). في حالتنا نحن غذينا الكومبيوتر بمعلومات المصنع الذي صممناه لأجل الحصول على تقديرات معقولة لاستهلاك المواد والكادر والتكاليف الأخرى. لكن يبقى من الضروري أن نأخذ في الحسبان بأن تقديرات محاكيات المعالجة تعتمد بشكل كبير على المعلومات التي توفرها أنت.

1.6.11 استهلاك المواد الكيميائية Consumption of chemicals

غالباً ما يدعى بأن تكاليف المواد الخام، ومن ضمنها تكاليف المادة الأولية، تكون نسبة أعلى من تكاليف تشغيل مصنع لعمليات التقنية الحيوية مقارنة بالعمليات الكيميائية التقليدية. علماً أنها أكثر تمايزاً من ذلك حيث إن قيمة المنتوج ستلعب دوراً. فبالنسبة إلى المنتوجات العلاجية عالية القيمة، لا تشكل المواد الخام جزءاً

مهماً من تكاليف العملية، في حين أن المنتوجات ذات القيمة المنخفضة، مثل الأنزيمات التي تنتج بكميات كبيرة، أو الأحماض العضوية، فإن اقتصاديات المصنع تعتمد كثيراً على إبقاء تكاليف المواد الخام منخفضة. الجيمفرلين مثلاً هو منتوج عالي القيمة نسبياً، وعليه فإن الإبقاء على كلفة المادة الأساس منخفضة ليس ضرورياً. ولكنه، عامل مساعد لتحسين ربحية العملية. كما أنه في معظم عمليات التخمير، فإن المصدر الكربوني يمثل المادة الأولية الأكثر كلفة. في هذه المرحلة نحن نستخدم السكروز، ولكن هناك مصادر أرخص، مثل المولاس (Molasses) وعصير الذرة، وهي بدائل يمكن أن تؤخذ بعين الاعتبار. إضافة إلى ذلك، فعند البحث عن مواد أولية رخيصة، يجب أن تدرك أن المادة الأولية المستعملة يجب أن لا تتداخل مع أي من مراحل ما بعد التخمير. في حالتنا، لقد تركنا هذه المرحلة وراءنا، وذلك لأن الفحوص في المصنع الريادي قد انتجت تركيبة رخيصة للوسط الزرعي، وذات وفرة حيوية عالية، وتزويد ثابت خلال السنة. إن المادة الكيميائية الوحيدة المطلوبة الإضافة إلى المادة الأولية هي المذيب الذي يستخدم في ترسيب المنتوج. نحن نستعمل الإيثانول لذلك. إن الاستهلاك الكلي للمواد الكيميائية موضح بالجدول 4.11. لاحظ أن الأسعار المسجلة في الجدول تمثل أسعار الجملة وهي تختلف كثيراً عن الأسعار العالية للمواد التي تجهز للمختبرات.

الجدول 4.11: تركيب الوسط الزرعي والتكاليف السنوية

المكون	التركيز (kg/m3)	السعر kg/يورو	الكلفة السنوية (يورو)
سكروز	50	0.8	35640
$(NH)_2 SO_4$	5	1.8	8091
KH_2PO_4	2	4.11	7324
$MgSO_4$	1	0.36	321
$FeSO_4$	$10^{-3}x5$	0.35	2
$ZnSO_4$	$10^{-3} x 2$	1.23	1
$CuSo_4$	$10^{-3}x1$	1.44	1
ثايامين	$10^{-3} x 10$	34.34	306
ايثانول		0.2	91106
المجموع الكلي			142790

الإطار 7.11

أحد الأسباب المهمة للدخول في تفاصيل كلفة الوسط الزرعي هو أنه خلال العمليات الموسعة يكون من المهم إيجاد الوسط الأمثل. في الوقت الذي يمكن فيه تحمل درجة من الاستخدام السيىء لمكونات الوسط على مستوى العمليات المختبرية، إلا أن مثل هذا الشيء لا يمكن تحمله على المستويات الضخمة. يصح هذا خاصة على مكونات الوسط الأكثر غلاءاً، التي هي في حالتنا تمثل السكروز. يوضح كذلك أن استرجاع المذيب (انظر الفقرة 4.11) يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار كجزء من عملية تقليل

سنلقي الآن نظرة على جميع الفقرات الأخرى التي تساهم في تكاليف التشغيل الكلية.

2.6.11 كلفة العمل Labour costs

تشغل مصانع التخمير على شكل مناوبات يومياً وبواقع 8 ساعات للمناوبة الواحدة ولسبعة أيام في الأسبوع. تعتمد تكاليف العمل كثيراً على درجة ضخامة الإنتاج، وبما أن مستوى الأجهزة ودرجة المكننة عالية جداً في المصانع الحديثة فالحاجة الكلية إلى العمل قليلة نسبياً. وللحصول على تقدير تكاليف العمل فمن الضروري معرفة موقع المصنع، حيث تتأثر الرواتب كثيراً بالموقع الجغرافي. في حالتنا الراهنة، افترضنا موقعاً في وسط أوروبا وعاملَ كلفةٍ اجتماعياً (Social cost factor) قدره 0.3 (تأمين وطني، رواتب العطل... ألخ)، أي أن الكلفة = الراتب × 1.3. هذا وإن كل مناوبة عمل تحتاج إلى وجود مشرف والذي يكلف 1.4× عامل المناوبة. (Shift worker)

3.6.11 المرافق Utilities

الكهرباء Electricity

إن عمليات مصانع التخمير مثل التهوية، والخفق، والتسخين، والتبريد، والضخ تستهلك جميعها الكهرباء وبكميات كبيرة!. كقاعدة فإن مخمراً من نوع الخزان

المخفوق يتطلب قدرة كهربائية مقدارها 1 HP لكل مئة غالون للخفق مع 5 kw/ لكل متر مكعب مائع للتهوئة. وبما أن مخمر الإنتاج يشتغل لــ 168 ساعة في كل دفعة، فإن فاتورة الكهرباء ستكون كبيرة. المساهم الرئيسي الآخر في فاتورة الكهرباء الكبيرة هو المبخر. أما الوحدات الباقية فهي إما أن تكون ذات متطلبات منخفضة الطاقة أو أنها تعمل لفترة قصيرة، وبهذا فهي لا تساهم بشكل كبير في استهلاك الطاقة.

الماء Water

يعتبر الماء، تقليدياً، كعامل كلفة أساسي لأن معظم أنواع المصانع والعمليات التخميرية تستهلك كميات كبيرة منه. وعليه فمن المفيد أن يكون هناك بئر خاص بك في الموقع، وأن تكون قد طوعت عملية التخمير بحيث تقبل استعمال ماء الحنفية (تذكر أن موقع المصنع هو في وسط أوروبا) بحيث لا يحتاج الماء المستعمل أي عمليات تنقية خاصة.

البخار Steam

يستعمل البخار تحت الضغط العالي في أجهزة التعقيم وفي المبخرات. وبالنسبة إلى أجهزة التعقيم المستمرة ، فإنها تحتاج حوالى 2kg من البخار لكل دورة تعقيم. عموماً إن البخار هو من المرافق الأساسية لأننا بحاجة إلى العمل تحت ظروف معقمة، ولكنه لا يشكل عامل كلفة مهماً.

جميع الفقرات المشمولة في حساباتنا للحصول على تقدير لكلفة التشغيل موضحة بالجدول 5.11.

يلاحظ من الجدول 5.11 أن الفقرات المعتمدة على رأس المال، الانخفاض في القيمة (Depreciation) والصيانة هي أكثر العوامل المساهمة بالكلفة، يتبعها كلفة العمل والمواد الكيميائية. بما أنك تعرف الآن ما هي كلفة الوصول إلى إنتاج سنوي من الجميفرلين قدره 252 kg، عليك أن تقنع الممولين أن بإمكانهم الحصول على ربح جيد من هذه العملية.

الجدول 11-5: كلفة التشغيل		
الفقرة	**التفاصيل**	**الكلفة (1000×يورو)**
المواد الكيميائية		143
مشغلي المصنع	ثلاثة أشخاص بثلاث مناوبات	502
الكهرباء	0.08 يورو kw/hr	92
ماء مثلج	35 يورو لكل 10^6 كيلو سعرة حرارية	21
ماء تبريد	5 يورو لكل 106 كيلو سعرة حرارة	2
بخار	10 يورو لكل 106 كيلو سعرة حرارية	8
صيانة	10% من كلفة المصنع	646
تأمين	0.25% من كلفة المصنع	16
ماء	للمعالجات	20
انخفاض القيمة	افترض معدل ثابت مقداره 10%	646
ضرائب محلية	1% من كلفة المصنع	65
إدارة	15% من كلفة التشغيل	75
كلفة البيع	2% من كلفة التشغيل	47
المختبر	15% من كلفة الكادر	75
المجموع الكلي		2358

7.11 الحالة الاقتصادية للاستثمار

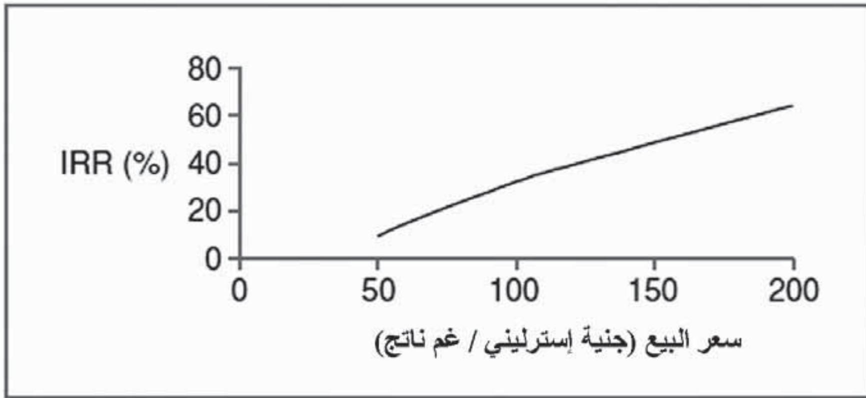
The economic case for investment

عندما نتحدث مع زملائنا الماليين، يجب أن يكون لدينا مقاييس اقتصادية يمكنهم من خلالها الحصول على تقدير أولي لربحية العملية. هذه المقاييس هي:

زمن السداد (Payback time) والهامش الإجمالي (Gross margin) وعائد الاستثمار (Return on investment) وهي معرفة كالتالي:

- زمن السداد (بالسنين) = الاستثمار الكلي/ صافي الربح
- الهامش الإجمالي (%) = الربح الإجمالي/الدخل
- عائد الاستثمار (ROI) = صافي الربح/الاستثمار الكلي

للحصول على المعلومات التي تستند إليها في اقتصاديات مشروعك فسوف نستخدم طريقة معدل العائد الداخلي (Internal Rate of Return-IRR) لغرض التحليل المالي، ولكننا نستطيع كذلك استعمال أي من الاثنين الآخرين. إن IRR هو العائد الذي تكسبه الشركة إذا توسعوا أو استثمروا في أنفسهم عوضاً عن استثمار تلك الأموال خارجاً. إن عائد الاستثمار الناتج من القيمة الحالية للمصنع مساوياً لكلفة الاستثمار، وإن القيمة الحالية لكل النقد الجاري (Cash flow) هو صفر عند معدل النقد الجاري المخصوم للعائد. يبين الشكل 6.11 العلاقة بين سعر البيع لمنتوجنا ومعدل العائد الداخلي الناتج.



الشكل 6.11: تأثير سعر البيع في معدل العائد الداخلي.

يلاحظ من الشكل 6.11 أنه وحسب عملية الإنتاج الموضحة أعلاه، فإن سعر البيع بقيمة 100 يورو للغرام الواحد من منتوجك سيعطيك عائداً قدره 32%.

إذا رفعنا سعر البيع فإن العملية ستبدو أكثر جذابة على الورق، ولكن قد يكون من الصعب جداً إيجاد العملاء الذي سيقبلون مثل هذا السعر المرتفع. على أي حال، بالنسبة إلى نوع العملية التي صممناها هنا فإن معدل العائد الداخلي بمقدار 32% سيكون معدلاً مقبولاً جداً، وسيكون هناك احتمال كبير لتزويدك بالمال اللازم للبدء في بناء معملك الخاص. علماً، أنه وقبل البدء بالبناء سيسألونك فيما إذا كان بإمكانك جعل المصنع أكثر ربحاً. لتجد الإجابة عن هذا السؤال عليك أن تجري تحليل حساسية الكلفة (Cost Sensitivity analysis).

حساسية الكلفة Cost sensitivity

هل من الممكن تحسين العملية؟ أو هل يمكن تقليل مقدار عامل الكلفة المفرد؟ حسب الجدول 5.11 فإن عوامل الكلفة الرئيسية هي:

- انخفاض القيمة Depreciation
- الصيانة Maintenance
- تكاليف العمل Labour cost
- المواد الكيمائية Chemicals

على الورق، فإن استخدام مصنع قديم تم شطبه (Written off) يجب أن يقلل من عامل انخفاض القيمة، ولكن المسؤولين الماليين سوف لا يسمحون لك عمل ذلك دائماً، وذلك لوجود نواحٍ مالية أخرى قد تلعب دوراً في هذه الحالة. كما أن من المحتمل جداً أن تكون كلفة صيانة المعمل القديم عالية جداً، وبالتالي خسارة أي فائدة مرجوة.

يمكن اختزال تكاليف العمل إذا فكرت باختيار موقع آخر، ولكن عليك أن تضع في الحسبان بأنك تحتاج إلى عمال ذوي مهارة عالية. وعليه فإن الانتقال إلى موقع آخر قد لا يكون ممكناً. البديل لذلك، هو إمكانية إيجاد أماكن إنتاج من خارج شركتك. إن تجاوز عقبة التمويل عن طريق التعاقد مع مصنّعين أصبح أكثر قبولاً بالنسبة إلى المنتوجات ذات القيمة العالية أو الوسطى. من المحتمل جداً أن تستطيع

التقليل من كلفة المواد الكيميائية. استرجاع المذيب كوسيلة للتقليل من كلفة المذيب قد ذكرناه سابقاً، وكذلك استعمال المولاس و/أو الذرة كمصدر للكربون قد ذُكروا سابقاً أيضاً.

تحديد السعر Price mark-up

أثناء عملك على إيجاد وسائل ممكنة لتحسين العملية، عليك أن تتنبه إلى شيء آخر. أنت منتج ولست موزعاً لمنتوجك. إن منتوجك وقبل أن يصل إلى المستهلك يجب أن يخلط مع مكونات خاملة مناسبة، وأن يعبأ في أغلفة جذابة. وبما أن منتوجك هو ناتج صناعي للعناية بالصحة، فبإمكانك أن تضرب سعر البيع الذي تحدده بعامل قدره أربعة أو خمسة للحصول على السعر الذي سيدفعه المستهلك. هل سيدفع المستهلك العادي بين 400 إلى 500 يورو لمنتوجك؟ إذا كان الجواب كلا فستجد صعوبة بالغة في إيجاد موزع يشتري منتوجك بسعر 100 يورو للغرام الواحد. لذا عليك بقبول معدل عائد داخلي أقل من 32%. وفي هذه الحالة عليك أن تبذل جهداً أكبر لإقناع الممولين الماليين بالاستثمار في مشروعك.

8.11 الاستنتاج Conclusion

إن تقدير اقتصاديات العملية أو الاقتصاد الكامن لأي عملية تقنية حيوية هي مسألة بسيطة نسبياً. وهناك العديد من الوسائل مثل محاكيات المعالجة، والكتب، ونشريات WWW التي توفر كل المساعدة التي تحتاجها. وكلما وفرت تفاصيل خاصة أكثر لها علاقة بالعملية التي تقوم بها كان بإمكانك الحصول على تقدير أفضل. من الأشياء الأخرى والمهمة جداً، هو تواصلك مع الآخرين الذين لهم علاقة بالنواحي الأخرى مثل التحقق من العملية (Verification) والموافقة (Approval) عليها، والذين لهم علاقة بالبيع والتسويق. وما لم يعطك هؤلاء الناس الضوء الأخضر، فإن أي رقم قد تأتي به سوف لا يكون له أي صلة بالواقع الحقيقي الذي تحلم به، خصوصاً فيما يتعلق برؤية منتوجك مطروحاً في الأسواق.

Further reading 9.11 قراءات إضافية

Peters, M. S. and K. D. Timmerhaus, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1980. It may be beginning to show its age, but it is still a very valuable and informative textbook.

Reismann, H. B. *Economic Analysis of Fermentation Processes*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. Basic textbook with lots of practical information. The presentation is very dated but it is still a good read if you need help.

Kalk, J. P. and A. F. Langlykke, "Cost Estimates for Biotechnology Projects." in: A. L. Demain and N. A. Soloman, eds., *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1986, pp. 363-385. Another text that is still used extensively in spite of the years gone by since its publication.

Petrides, D. "Bioprocess Design and Economics." in: R. G. Harrison, P. W. Todd, S. R. Rudge and D. Petrides, eds., *Bioseparation Science and Engineering*. Oxford: Oxford University Press, 2003. Good on production details, but you might be better off buying the intelligent simulation package if you can afford it.

Process Simulation Software

BioPro and SuperPro Designer. From Intelligen, Inc., USA, handles material and energy balances, equipment sizing and costing, economic evaluation, environmental impact assessment, process scheduling, and de-bottle-necking of batch and continuous processes.

Biotechnology Design Simulator (BDS). Developed by Life Sciences International (Philadelphia, PA) focuses on scheduling of batch operations and resource utilisation as a function of time.

Batches. From Batch Process Technologies (West Lafayette, IN) is a batch process simulator that has found applications in pharmaceutical, biochemical and food processing industries. It is especially useful for fitting a new process into an existing facility and analysing resource demand as a function of time.

Biokinetics. From Alfa Laval, modular designs that mainly focus on mammalian cell cultures. The modules are predominantly bioreactor modules, cell harvesting modules, purification modules and biodeactivation modules.

الجزء II

التطبيقات العملية

Practical Applications

الفصل الثاني عشر

الغربلة عالية الإنتاجية والظروف المثلى للعملية

High-Throuput Screening and Process Optimisation

ستيفن دويغ — **Steven D. Doig**

الكلية الجامعة، لندن، المملكة المتحدة — University College London, UK

فرانك باغانز — **Frank Baganz**

الكلية الجامعة، لندن، المملكة المتحدة — University College, London, UK

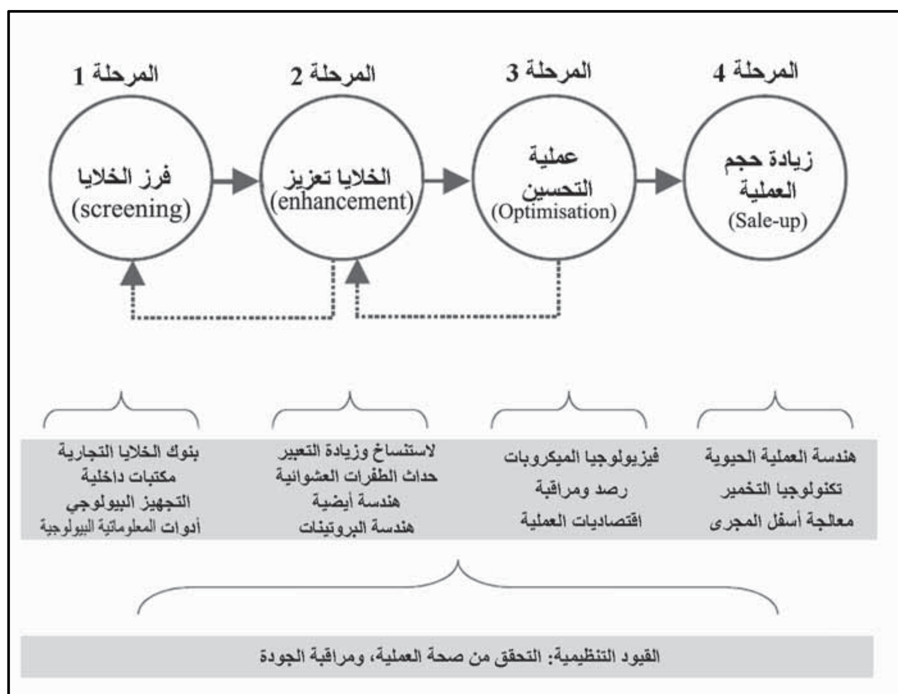
غاري لي — **Gary J.Lye**

الكلية الجامعة، لندن، المملكة المتحدة — University College, London, UK

1.12 المقدمة Introduction

إن الإنتاج الحيوي للمكونات الفعالة، بدءاً من الجزيئات الصغيرة مثل الأحماض العضوية أو الفيتامينات أو مضادات الحيوية إلى الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات العلاجية أو النواقل الجينية البلازميدية للعلاج بالجينات، له قيمة تجارية واجتماعية عظيمة. إن الحجر الأساس في أي من هذه العمليات الحيوية هو خطوة زرع الخلايا حيث يؤخذ خط خلايا (Cell line) منتقى بدقة، وغالباً ما يكون مهندساً وراثياً وينمّى تحت ظروف مسيطر عليها. يستخدم مصطلح خط الخلايا هنا ليمثل

الخلايا الميكروبية وخلايا اللبائن (Microbial and mammalian cells). إن هدف خطوة الزرع هو الحصول على المنتوج بطريقة كفوءة وبكلفة مقبولة ما أمكن ذلك. علماً، أن تصميم وتنفيذ عملية زرع الخلايا غالباً ما تكون معقدة ومطولة ومكلفة. إن تطوير عملية زرع الخلايا تشمل عادة أربع مراحل، وكما موضح بالشكل (1.12). تشمل **المرحلة 1** التشخيص الأولي لخط الخلايا الطبيعي أو البري (Native or Wild – type) الذي ينتج المركب المطلوب، وعادة ما يكون الإنتاج بطيئاً وبمستويات منخفضة. يتبع ذلك **المرحلة 2**، التي يتم من خلالها زيادة إنتاجية خط الخلايا المختار [g product /(g cell) /h] باستخدام تقنيات ميكروبية أو بيولوجية جزيئية. أما **المرحلة 3** فتشمل تحديد الظروف الأمثل لمكونات الأوساط الزرعية وظروف الزرع، في حين تشمل **المرحلة 4** توسيع العملية من مستوى المختبر وخلال المصنع الريادي وصولاً إلى المستوى التصنيعي.



الشكل 1.12: مخطط توضيحي لعملية غربلة وتطوير نموذجية. تمثل الأسهم المنقطة دورات متداخلة محتملة ناشئة من عملية التفاعل بين المراحل. المساهمات الرئيسية والعوامل التي يجب أخذها بعين الاعتبار عند كل مرحلة موضحة داخل صناديق.

1.1.12 التجريب العالي الإنتاجية

High – throughput experimentation

تجري عمليات تطوير مزارع الخلايا، تقليدياً، بعد إجراء سلسلة من التجارب باستخدام أجهزة تقليدية تتطلب جهداً عملياً كبيراً. ويقتضي إجراء التجارب التقليدية عادة القيام بتجربة واحدة فقط أو عدد قليل من التجارب في الوقت الواحد، وتراقب هذه التجارب بالتفصيل. وحالما تجمع النتائج يتم تحليلها، حيث تقود المعلومات المستحصلة إلى تصميم السلسلة التالية من التجارب. على الرغم من أن هذه الطريقة تبدو للوهلة الأولى على أنها عقلانية جداً، إلا أنها غير مناسبة في الظروف التي يتطلب فيها إجراء عدد كبير من التجارب. يبدو كذلك، أن هذه الطرق لم تعد ملائمة تجارياً لأن سرعة الوصول إلى السوق هو عامل مهم في زيادة عائد الاستثمارات وفي البحث عن الأنواع الجديدة من الأدوية (انظر الفصلين الحادي عشر أو الثالث عشر). ونتيجة لذلك، فقد تبنت صناعة التقنية الحيوية (Biotechnology) طريقة جديدة سميت التجريب عالي الإنتاجية (High – throughput experimentation) أو HTE، والذي يؤشر إلى التجريب المتوازي حيث تربط الأتمتة والتشغيل الذاتي على المستويات الصغيرة لكي توفرا معلومات ذات نوعية أفضل بسرعة أكبر، وبكلفة أقل.

إن الطرق عالية الإنتاجية، وبغضّ النظر عن هدف التجربة، تمكن من اختبار عدة متغيرات بنفس الوقت، مثل نوع الخلايا، ومصادر الكربون والنتروجين، وتركيز المغذيات، والرقم الهيدروجيني، ودرجة الحرارة. ويتطلب هذا بالتأكيد العمل بالتوازي (Parallelism)، أي إجراء عدة تجارب جنباً إلى جنب بدلاً من إجرائها بالتتابع. ونتيجة لكثافة التجارب، فإن التجريب عالي الإنتاجية غالباً ما يستخدم قواعد آلية مختبرية (Laboratory Robotic Platforms) تمكّن من مكننة التجارب، بحيث يصبح الإشراف على عدد كبير من التجارب التي تجري في نفس الوقت ممكناً. علاوة على ذلك، وبسبب العدد الكبير من التجارب التي يمكن إجراؤها، هناك إمكانية لاختزال حجم كل منها لكي نقلل كلفة التطوير. يوضح الجدول (1.12) بعض التطبيقات النموذجية للتجريب عالي الإنتاجية.

الجدول 12–1: بعض الأمثلة العامة لفوائد التجريب عالي الإنتاجية عند كل مرحلة من مراحل تطوير مزرعة الخلايا

الهدف التجريبي	التعليقات	أمثلة
تشخيص خط الخلايا الأصلية (wild) الذي يظهر نشاطاً أنزيمياً متميزاً.	• بنوك الخلايا الموجودة في المختبر قد تتراوح من عشرات إلى عدة آلاف من خطوط الخلايا. • يمكن فحص بنوك الخلايا روتينياً للكشف عن نشاط محفز (حفاز) حيوي نحو مواد وسطية جديدة في مسار تصنيعي.	• اللايبيز لإنتاج كحولات الجايرال (Chiral) والأحماض، • محفزات حيوية خلوية كاملة مؤكسدة ومختزلة. • أنزيمات قادرة على تكوين أصره C-C غير متناظرة.
غربلة مكتبة الخلايا (Cell library) للكشف عن إنتاج محسن لمادة أيضية	• التقنيات التقليدية مثل الطفرات العشوائية تنتج العديد من خطوط الخلايا ذات نواتج محسنة • هندسة اندماجية للـــ الحفاز الحيوي/الأيض	• عيارية عالية للمضاد الحيوي من مزارع خلايا الفطريات. • تحسين نواتج الأيض الأولي من الأحماض والكحولات.
تطوير الأنزيم إلى خصوصية محسنة	• استخدام مختلف التقنيات الوراثية، يمكن تحوير نشاطات الأنزيم وفحصه بسرعة. • التطور الموجه يولد الآلاف من خطوط الخلايا يعبّر كل منها عن أنزيمات متغايرة.	• أنزيمات ذات نشاط زائد، أو تغير في الخصوصية أو تحمل مدى أوسع من الرقم الهيدروجيني الأمثل والحرارة المثلى.

الوصول إلى التركيب الأمثل لوسط النمو والظروف المثلى للعملية	• تركيب الوسط يؤثر في أداء مزرعة الخلايا وفي اقتصاديات العملية. • يمكن استخدام التصميم التجريبي لتحسين الظروف مع بقاء الحاجة إلى إجراء 10 إلى 100 تجربة	• تحديد أفضل مصادر C، N وتحديد تراكيزهما وتفاعلهما. • اختيار ومقارنة أوساط النمو المعقدة، مثل سائل منقوع الذرة، المتحللات المائية البروتينية... إلخ.
تحديد حركيات (kinetics) النمو وتحديد المحصول ومتطلبات الأكسجين	• المعايير الحركية ومعايير المحصول ضرورية جداً لعملية التضخيم. • الظروف المحددة بشكل جيد (الأكسجين والرقم الهيدروجيني) مطلوبة للسيطرة على العملية المثلى.	• مقاييس حساب حركية العملية. • تأسيس نقاط محددة للأكسجين الذائب والرقم الهيدروجيني.

2.12 اعتبارات عامة لزرع الخلايا

Generic considerations for cell cultivation

هناك عدة عوامل أساسية لنجاح زراعة خطوط الخلايا والتي يجب أن تؤخذ بعين الاعتبار، بغضّ النظر عن سعة العملية أو التجربة عالية الإنتاج. العملية المعقدة تعتبر أساسية لمعظم التطبيقات. كما يفترض أن تكون هناك حاجة إلى السيطرة على المقاييس الفيزياوية والهندسية، بغضّ النظر عن كون عملية التطوير تجري على طريقة الإنتاجية العالية أو الطريقة التقليدية. كذلك، فإن المعلومات المستحصلة، مثل النتائج حول معدلات نمو الخلايا وكميات المنتوج، والتي على أساسها تتخذ القرارات التي تخص العملية، تكون هي نفسها، بغضّ النظر عن مستوى الإنتاجية.

1.2.12 العملية المعقمة Aseptic operation

تعني العملية المعقمة لسيرورة حيوية معينة زرع خط الخلايا المختار في زرعة (Culture) خالية من التلوث بكائنات غير مرغوبة أو انتهازية. خصوصاً عند استخدام خطوط خلايا مهندسة لأنها تنمو عادة بشكل أبطأ من نمو سلالات النوع البري. إن مثل هذه التلوثات تؤدي، في أحسن الأحوال، إلى اختزال كمية المنتوج المرغوب، وفي أسوأ الحالات تتسبب في إيقاف التجربة وتدمير الخلايا المنتخبة. وبالنسبة إلى مزارع الخلايا المنتجة لمواد علاجية فإن نمو مزرعة أحادية خالية من أي تلوث ضرورة مطلقة.

2.2.12 السيطرة على البيئة الفيزيائية والهندسية

Control of physical and engineering environment

تتطلب العمليات الكفوءة لزارعة الخلايا السيطرة على مقاييس فيزيائية رئيسية وعلى تصميم المفاعل الحيوي بحيث يمكنه تجهيز الأكسجين بمعدلات مناسبة. لسوء الحظ فإن تركيز التشبع بالأكسجين في الأوساط السائلة يكون منخفضاً جداً (عادة 5 إلى 7 mg/L). وبهذا فإن التجهيز الكفوء والمستمر للأكسجين، الذي يكون عادة على شكل هواء، أمر في غاية الأهمية.

إن تجهيز الأكسجين هو مفتاح التصميم والعمل الناجح للمفاعل الحيوي، وبالذات في المستوى الصناعي هذا ويمكن أن يحدث تحت ظروف فقر الأكسجين العديد من الظواهر المضرّة. لذا يكون من المهم خلال مرحلة غربلة خطوط الخلايا (المرحلة 1) ومرحلة تحسين الخلايا (مرحلة 2) من عملية التطوير، أن يكون هناك معرفة وفهم لمستوى الأكسجين الذائب خلال عملية الزرع. كما أنه من الضروري جداً، وأثناء عملية تحديد الظروف المثلى (المرحلة 3)، قياس مستوى الأكسجين والسيطرة عليه كأساس لمرحلة التوسع التالية (المرحلة 4).

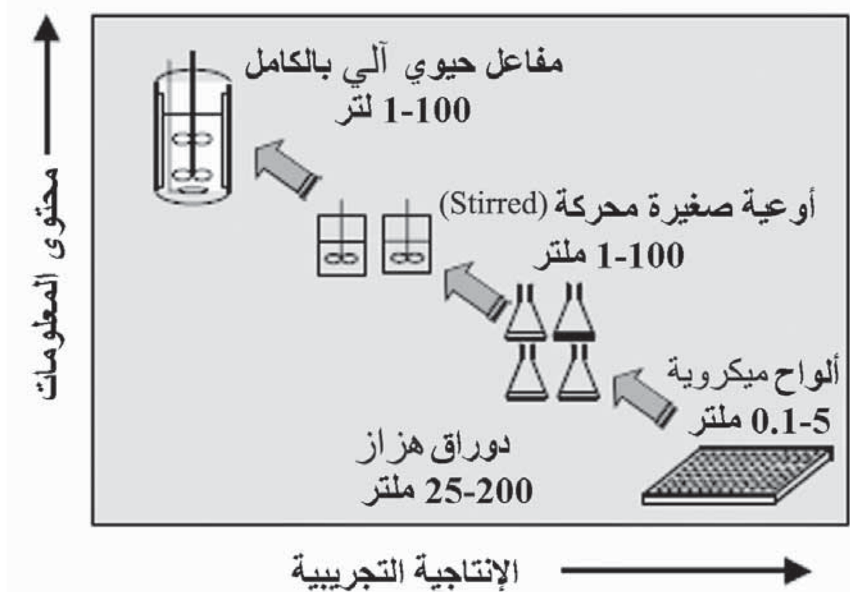
من المقاييس الفيزيائية الرئيسية الأخرى التي تؤثر في الأداء الخلوي هو الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة. وهنالك رقم هيدورجيني أمثل ودرجة حرارة مثلى لكل مزرعة خلايا، وبهذا يجب قياس هذه المعايير والسيطرة عليها لكي يمكن الحصول على تقييم صحيح لحركية النمو وتكوين المنتوج. بما أن معظم العمليات الحيوية لا تكون باعثة (Exothermic) أو ممتصة (Endothermic) للحرارة بشكل كبير، فإن السيطرة على درجة الحرارة خلال عملية غربلة الخلايا وعملية تحديد الظروف المثلى لا تمثل مشكلة عادة، باستثناء العمليات الضخمة (انظر الفصل السابع). من الناحية الأخرى، فإن السيطرة على الرقم الهيدوجيني قد يكون تحدياً، وبالخصوص في العمليات على المستويات الصغيرة، وهذه السيطرة ضرورية جداً خلال جميع مراحل غربلة الخلايا، وتحدد الظروف المثلى لزراعة الخلايا.

3.2.12 تحديد معايير نمو الخلايا وتكوين المنتوج

Determination of cell growth and product formation parameters

إن العديد من المعايير التي تعطي قيماً كمية لأداء خط خلايا معين قد تم الحديث عنها سابقاً (في الفصلين الثالث والسادس). ويمكن وتوصيف حركية نمو الخلايا، وكمية إنتاج الكتلة الحيوية، على الكربون والأكسجين والنتروجين، وتكوين نواتج خاصة، باستخدام معايير كمية، وإن هذه المعايير تمثل النتائج الرئيسية من أية برامج لغربلة خط الخلايا ولتحديد الظروف المثلى لزراعتها. عادة، يتم تحديد هذه المعايير لعدة خطوط خلايا مختلفة، نامية على أوساط زرعية مختلفة وتحت ظروف بيئية مختلفة. ولتوضيح أهمية المقارنة الكمية فإن انتقاء خط خلايا من كتلة خلايا معينة ينتج أكبر كمية من المنتوج ربما يبدو مثالياً، مع أن خط الخلايا هذا قد يكون بطيء النمو، أو قد لا ينمو بالدرجة الكافية على مصدر الكربون أو النتروجين المتاحين، وعليه، فسوف لا يكون الخيار مثالياً. وعلى سبيل المثال، إن خط خلايا بري ينتج أنزيماً هدمياً (Cetabolic enzyme) معيناً يستعمل في عملية التحويل الحيوي، وأنه يوفر محصولاً عالياً من المنتوج من حيث الكتلة الحيوية، ولكنه ينمو ببطء. من ناحية أخرى، إن خط *E.coli* هجين مهندس وراثياً لإنتاج نفس الأنزيم قد تكون تنميته أسهل كثيراً وأسرع ولكنه يعطي كمية أقل من

المنتوج المرغوب. تعتمد عملية اختيار الأفضل من هذين الخطين على اقتصاديات المنتوج والعملية الإنتاجية، ولكن المثال يوضح أن تحديد هذه المعايير الحيوية هو أساسي في تطوير أي عملية عالية الإنتاج.



الشكل 2.12: العلاقة بين الإنتاج التجربي، حجم العملية والمعلومات المستحصلة لأوعية مختلفة لزرع الخلايا (أخذ الشكل من المنشورات التجارية التي تصدرها DasGip .(<http://www.dasgib.de>).

3.12 الأجهزة عالية الإنتاجية لزراعة الخلايا

High – throughput cell cultivation equipment

هناك العديد من التصاميم المختلفة للمفاعلات الحيوية نصف المتخصصة (Semi specialized) والمتوفرة لغرض الإنتاج الكثيف لمزراع الخلايا. يمكن تصنيف هذه المفاعلات حسب سعة العملية إلى: (أ) المفاعلات الحيوية التقليدية (ب) الدوارق المهزوزة (Shake flasks)، (ج) صفائح العيار الحجمي الحجمي الميكروي (Microtiter plates). يوضح الشكل (2.12) حجم ومستوى الإنتاج التجريبي الذي يمكن الحصول عليه من كل تصميم مقابل الكمية، والدقة، فائدة

المعلومات التي يمكن جمعها عن نمو الخلايا وتكوين المنتوج. كما سنناقش لاحقاً، وكما هو موجز بالجدول (2.12)، فإن هناك علاقة قوية بين مستوى الإنتاج التجريبي و11`كمية المعلومات التي يمكن الحصول عليها.

1.3.12 المفاعلات الحيوية Bioreactors

للعمل مع مزارع (Cultures) يفوق حجمها 1 لتر، فإن المفاعلات الحيوية، وبالذات مفاعلات الخزانات المخفوقة، تعتبر أوعية زرع مثالية وذلك لسهولة استعمالها النسبي. فهي توفر بيئة محددة بشكل جيد لنمو الخلايا وهي مقبولة من قبل الصناعيين ومنذ فترة طويلة. والأكثر أهمية من ذلك، هو توفر معلومات كثيرة حول هذا النوع من المفاعلات تراكمت خلال سنين عديدة من الاستعمال. إن البيئة الهندسية معروفة بشكل جيد، وإن المعلومات المستحصلة من مثل هذه الأجهزة يمكن تطبيقها مباشرة في عملية التوسع، وذلك لأن الخزانات المخفوقة على مستوى المختبر مشابهة هندسياً للأوعية التي تستخدم في المصانع الريادية أو في الإنتاج الصناعي الأوسع. علاوة على ذلك، فإن إمكانية أخذ نماذج كبيرة الحجم تجعل من استخدام الأجهزة التحليلية الأكثر دقة ممكناً مما يتيح الحصول على مستوى لا نظير له من المعلومات حول العملية.

العائق الرئيسي في مفاعلات الخزانات المخفوقة، على مستوى المختبر، هو المستوى المنخفض للإنتاج التجريبي والمستوى العالي للمواد الخام المطلوبة بسبب حجم العملية. إن تهيئة مفاعل حيوي مخفوق مجهز بالكامل تشمل تنظيف وتحضير الوسط الزرعي، والتعقيم، وتقييس المسابر (Probes)، والتلقيح وهي عمليات تستغرق وقتاً طويلاً وتحتاج إلى أداء تقني ماهر. وعليه، فإن عدد التجارب التي يمكن أن تجري في نفس الوقت محددة بـــ 1–5 لكل شخص. هذا ويمكن أن تكون تكاليف الوسط الزرعي عالية جداً أثناء عملية التطوير، وخاصة بالنسبة إلى مزارع خلايا اللبائن، لذا فإن الأحجام الأكبر لهذه الأوعية يمكن أن يحد من عدد التجارب التي يمكن إجراؤها.

الجدول 2.12. نظرة عامة في مقارنة المعدات التقليدية وعالية الإنتاجية المستخدمة حالياً لتطوير عملية زراعة الخلايا			
جهاز زرع الخلايا	**الإنتاج النمطي التجربي**	**مستوى التحكم والمراقبة**	**كلفة العملية**
مفاعل حيوي تقليدي من نوع الخزان المخفوق 1–100 لتر	منخفض 1–5 لكل تقني يعمل في المختبر	عالي: الرقم الهيدروجيني pH، أوكسجين، حرارة، كتلة حيوية ومنتوج	عالي: رأس المال، المواد الخام والعمال
مفاعل حيوي مخفوق مصغر 10–100 مل	منخفض/وسط: 20 لكل تقني	عالي: pH أوكسجين، حرارة، كتلة حيوية ومنتوج	وسط: رأس المال والعمال
الدوراق الهزازة 25–100 مل	وسط: 50 لكل تقني كحد أقصى	منخفض: الحرارة، الكتلة الحيوية والمنتوج	منخفض
صفائح العيار الحجمي الميكروي 0.1–5 مل لكل وعاء	عالي جداً: آلاف لكل تقني	منخفض: الحرارة، الكتلة الحيوية والمنتوج	وسط: رأس المال، زيادة في استخدام المواد المستهلكة

لتجاوز هذه المحددات فقد أصبح شائعاً استعمال الخزانات المخفوقة المصغرة، التي هي بالحقيقة نسخ مصغرة من الخزانات المخفوقة التقليدية. فهي مشابهة هندسياً للخزانات التقليدية وتوفر محاسن البيئة المحددة بشكل جيد، علاوة على توفير البيئة المعقمة. وبما أنها ذات أحجام صغيرة فمن محاسنها الاقتصاد في المواد الخام مما يختزل كلفة تطوير العملية. علاوة على ذلك فهي أكثر ملائمة للعمل المتوازي، حيث يمكن تشغيل عدة خزانات أخرى، إلى حد ستة عشر خزاناً، بنفس الوقت من قبل تقني واحد. توفر هذه الخزانات كذلك معدل نقل أكسجين عالٍ نسبياً (k_La تصل إلى 500/h) بسبب الاستخدام المستمر للخفاق الدوار في عملية الخلط.

ولسوء الحظ، إن أقطاب (Electrodes) الرقم الهيدروجيني والأكسجين التقليدية التي تستخدم عادة مع مفاعلات الخزان المخفوق ذات الأحجام الكبيرة، لا يمكن استخدامها مع الخزانات الصغيرة. وعليه يكون من الضروري استخدام مسابر بديلة متخصصة وأكثر كلفة. فعلى سبيل المثال، يمكن تثبيت صبغات حساسة للأكسجين و/أو الرقم الهيدروجيني على نهايات كابلات (Cables) مكونة من ألياف بصرية لصنع مسابر صغيرة جداً (بقطر 1−2 mm). سنناقش لاحقاً هذه الصبغات واستخدامها لمراقبة المزارع الصغيرة، وبتفاصيل أكثر.

الجدول 3.12: محاسن ومساوئ أوعية الزرع المهزوزة مقارنة (Shaken cultivation vessels) بالمفاعلات الحيوية المخفوقة القياسية

المحاسن	المساوئ
سهلة التشغيل	كفاءة أقل للنقل الكتلي للأكسجين
متطلبات أقل للمواد ورأس المال المستثمر	صعوبة عمليات المراقبة والسيطرة
إنتاجية أعلى	معايير التوسع غير معروفة بشكل جيد
متطلبات عمل أقل	معلومات أقل من التجربة الواحدة

2.3.12 الدوارق الهزازة Shaken flasks

استخدمت الدوارق المخروطية المعروفة باسم دوارق إيرلين ماير (Erlenmeyer) لسنين عديدة في زراعة خطوط الخلايا، وهي ربما لا تزال أكثر الأوعية الزرعية استعمالاً في المراحل المبكرة من عملية التطوير. ونموذجياً تعمل الدوارق المهزوزة بأحجام عمل تتراوح بين 25 و 500 ml.

لعملية الهز محاسن ومساوئ عند مقارنتها بالخزانات المخفوقة التقليدية، وكما هو موجز بالجدول (3.12). تزيد عملية الهز من عمليتي الخلط والنقل الكتلي للأكسجين. وما يحدد معدل هاتين العمليتين هو هندسة الدورق وحجم السائل فيه وشدة الهز (تردد وسعة الهز). نموذجياً، يستعمل تردد هز بمقدار 100−400 دورة بالدقيقة، وإن سعة هز بين 1−5 cm هي الشائعة. تتوفر الحاضنات الهزازة تجارياً

وبشكل واسع، وإن طريقة هز الدوارق قد تكون دائرية (Ortibal) أو خطية (Linear). ويفضل عادة استخدام طريقة الهز الدائري لأنها تقلل من الترشاش (Splashing) ومن النمو على الجدران. يتوفر كذلك حاضنات هزازة مزودة بسيطرة على درجة الرطوبة، وبهذا فإنها تحدّ من عملية تبخر الماء من الدوارق.

تعمل الدوارق الهزازة عادة بحجم امتلاء (Fill volume) يبلغ 10–25%، وبهذه الطريقة نحصل على نسبة مساحة سطحية/حجم بين 100–500 m^2/m^3. إن هذا الشيء مهم جداً لأن النقل الكتلي للأكسجين يحدث فقط من خلال التهوية السطحية في هذا النوع من الأوعية، وبذلك فإن الخلايا المزروعة في هذه الدوارق تكون أكثر حساسية لمحدودية الأكسجين مما هي عليه في الخزانات المخفوقة. يتحرك الوسط السائل، أثناء الهز الدوراني المستعمل عادة، حول الدورق على شكل موجة، وبهذا فإن خلط الطور السائل لا يكون بنفس الكفاءة التي يكون عليها في الخزانات المخفوقة. هناك طريقة شائعة تستخدم للتقليل من هذه المشكلة ولزيادة معدل النقل الكتلي للأكسجين وهي استعمال دوارق تحتوي على حواجز (Baffles) في داخلها. تكون هذه الحواجز مصنوعة عادة من طيات زجاجية بارزة من جدار الدورق. نادراً ما يكون تصميم هذه الحواجز محدداً بشكل جيد، لذا فإن هناك فروقاً واضحة في عمليات الخلط والنقل الكتلي للأكسجين، وبالتالي في نمو الخلايا. علاوة على ذلك فإن إمكانية حدوث الرشاش واردة مما يؤدي إلى نمو جداري متزايد، وهي ظاهرة غير مرغوبة قد تؤدي إلى تبليل السدادة عند عنق الدورق. وتعمل عملية التبلل هذه على سد منافذ الأكسجين الموجودة في السدادة، وبالتالي فإن استخدام الدوارق ذات الحواجز له بعض المخاطر. بالنسبة إلى عملية التشغيل، فإن الأوعية الهزازة تكون عموماً سهلة التهيئة والعمل مقارنة بمفاعلات الخزان المخفوق. ولكن بسبب صغر حجمها وطريقة الخلط فإن ربطها بأجهزة المراقبة يكون أصعب، وبالتالي فإن مستوى المعلومات المستحصلة من هذه النظم لا يكون عالياً مقارنة بحالة الخزانات المخفوقة التقليدية. على الرغم من إمكانية تجهيز الدوارق الهزازة بمسابر مصغرة لقياس الأكسجين الذائب والرقم الهيدروجيني، إلا أن ذلك يكون متعباً عادة بسبب تعقيد الملحقات الميكانيكية المستعملة لربطها. ولكن مع ذلك، تتوفر بعض الأنظمة التجارية التي يمكن فيها السيطرة على

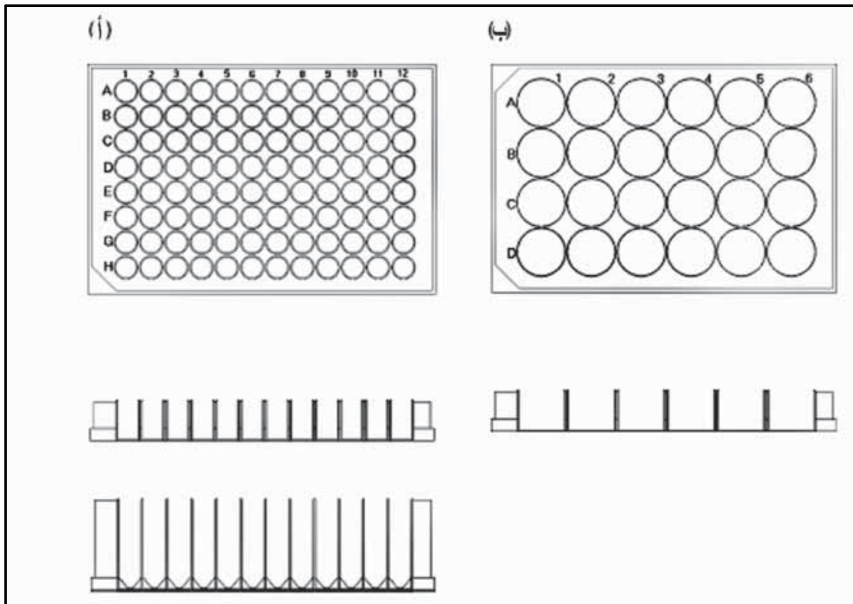
الرقم الهيدروجيني من خلال إضافة حمض و/أو قاعدة بصورة أوتوماتيكية. علماً، أن مثل هذا المستوى من التطور لا زال غير شائع، وأن السيطرة على الأكسجين الذائب لازالت غير ممكنة. والمشكلة الأخرى هي عملية أخذ النماذج. فبسبب صغر الحجم يمكن أخذ نماذج صغيرة فقط مما يجعل من عملية التحليل المسهب لنمو الخلايا وتكوين المنتوج غير ممكنة. علاوة على ذلك فإن أخذ النماذج من الدوارق الهزازة يتطلب إزالة الحاجز المعقم مما يمكن أن يسبب مشاكل تلوث. وكطريقة بديلة، يمكن التضحية بأحد الدوارق واستخدامه فقط لعملية أخذ النماذج، ولكن هذا قد يقود إلى مشاكل أخرى بسبب المتغايرات بين الدوارق المختلفة.

3.3.12 صفائح العيار الحجمي الميكروية Microtitre plates

بما أن هناك حاجة إلى إجراء تجارب عالية الإنتاجية، فإن صفائح العيار الحجمي الميكروية تستخدم الآن بشكل روتيني لزراعة خطوط الخلايا. تخلط محتويات الأوعية في الصفيحة بواسطة الهز كذلك، وبالتالي فإنها مشابهة في بعض النواحي للدوارق الهزازة. علماً، وكما هو موضح بالشكل (3.12) أن هندستها تختلف تماماً وهي تنتج بأبعاد قياسية 85 × 125 mm للصفيحة الواحدة. تتوفر صفائح تحتوي على أعداد مختلفة من الأوعية (Wells) تتراوح بين 6 و 1536 وعاءً في الصفيحة الواحدة، وتكون الأوعية المفردة ذات مقطع دائري أو مربع أو مثلث، ويمكن أن تختلف أعماقها بين 0.8 و 6 سم. وكذلك هناك اختلاف في حجم الإملاء وهو يتراوح ما بين 10 مايكرولتر للوعاء الواحد في الصفيحة المتكونة من 1536 وعاءاً و 20 ml في صفيحة الستة أوعية العميقة. ويمكن أن تصنع صفائح العيار الحجمي الميكروي من عدد من المواد مثل البولي ستايرين أو البولي بروبيلين والزجاج.

تتوفر سدادات لصفائح العيار الحجمي الميكروي للمساعدة في الحفاظ على العملية من التلوث وفي الحدّ من معدل التبخر. يمكن أن يكون التبخر عاملاً مهماً جداً عند درجات الحرارة العالية وفترات الزرع الطويلة إذا لم تتم السيطرة عليه. وإن السدادات التجارية المتوفرة مصنوعة عادة من أغشية بلاستيكية رقيقة وهي تستخدم إما مواد لاصقة أو وصلات حرارية لتوفير حاجز غير نفاذ للسائل على

سطح كل وعاء. هذا وإن هذه السدادات يمكن أن تحدّ من معدل النقل الكتلي للأكسجين، ولهذا السبب تترك الأوعية عادة بدون سدادات في حالة المزارع سريعة النمو. تجري عملية الزرع تحت مثل هذه الظروف في كابينات ميكروبيولوجية آمنة (Microbiological safety cabinet) لأجل تقليل فرص التلوث وتقليل انكشافها على التقنيين العاملين كذلك.



الشكل 3.12: هندسة صفيحة عيار حجمي ميكروي نموذجية. (أ) منظر عام لصفيحة قياسية ذات 96 وعاءً. يظهر المقطع العرضي الارتفاعات النسبية للأوعية الضحلة والعميقة. (ب) منظر رأسي ومقطع عرضي لصفيحة عيار حجمي ميكروية ذات 24 وعاءً. أبعاد الصفائح وأحجام الأوعية مدرجة بالجزء 3.3.12.

إن آليات خلط الطور السائل والنقل الكتلي للأكسجين لمزارع الخلايا في صفائح العيار الحجمي الميكروية هي نفسها المستعملة في الدوارق المهزوزة. إلا أنه، وبسبب صغر الحجم فإن شدة الهز تكون مختلفة!

تستخدم عادة سعة هز أقل (1-3 mm) وتردد أعلى (500–1500 دورة/دقيقة). وقد سجلت معدلات نقل كتلي للأكسجين تتراوح بين 100 و 200 في

الساعة عند استعمال صفائح العيار الحجمي القياسية ذات الــ 96 وعاءً دائرياً، والمملؤة بحجم عام حوالى 200 مايكرولتر. إن استخدام الأوعية المربعة أثبت فائدة في زيادة معدلات نقل الأكسجين في هذه الحالة يمكن أن تكون ضعف معدلات الأوعية الدائرية، ومعدلات نقل الأكسجين في هذه الحالة أعلى من تلك المستحصلة في الدوارق المهزوزة.

إن الفائدة الأولية لهذه الصفائح كأوعية لزرع الخلايا هي إمكان تقبلها لتقنيات الإنتاج العالي والمكننة. تنتج صفائح العيار الحجمي الميكروية بأشكال قياسية مما يجعلها قابلة للمكننة بشكل كبير. باستخدام صفائح ذات 96 وعاءً يمكن واقعياً انجاز 500–1000 زرعة خلايا في نفس الوقت، وبأقل ما يمكن من الجهد اليدوي (شرح أكثر بالجزء 12–3–4). إن العائق الرئيسي في استخدام هذه الصفائح هي صعوبة تجهيزها بأدوات المراقبة والسيطرة مقارنة بالنظم ذات الأحجام الكبيرة (انظر الجدول 2.12). وبهذا، فإن نوعية وكمية النتائج المستحصلة من التجربة الواحدة لا تكون بمستوى النتائج المستحصلة من مزارع الأحجام الكبيرة. وبما أن استخدام المسابر التقليدية للأكسجين الذائب والرقم الهيدروجيني غير ممكن في هذه الصفائح، فقد طورت مسابر بديلة تعتمد على استخدام الصبغات المتألقة (Fluorescent-dyes). ومن هذه الصبغات صبغة الروثينيوم (Ruthenium) المتألقة التي تستخدم كوسيلة لتقدير تركيز الأكسجين الذائب. تستعمل هذه الصبغة إما في طلاء طرف كابل الليف البصري، أو يمكن تثبيتها على رقعة سيليكون لاصقة مثبتة داخل كل وعاء في الصفيحة. عند إثارة الصبغة بواسطة دايود (Diode) باعث للضوء وبطول موجي معين، تتألق الصبغة بلون مميز يمكن استخدامه لتقدير تركيز الأكسجين. علماً أن الصبغة لا تستهلك الأكسجين وهي ذات استجابة عالية للتغيرات التي تحصل في مستوى الأكسجين الذائب. إن القطر الضيق لمسابر الألياف البصرية (1-2 mm) يعني إمكانية غرسها (إدخالها) في أنواع مختلفة من الأوعية الزرعية صغيرة الحجم، وقد تم تطوير مسابر مشابهة لقياس الرقم الهيدروجيني. بهذه الطريقة يصبح ممكناً قياس الرقم الهيدروجيني مباشرة، (on-line) خلال نمو خط الخلايا في صفائح العيار

الحجمي. علاوة على ذلك يمكن السيطرة على الرقم الهيدروجيني من خلال الإضافة الأوتوماتيكية للحمض أو القاعدة بواسطة ذراع آلي، ولكن هناك حدوداً لعدد وتردد الإضافات الممكن إجراؤها.

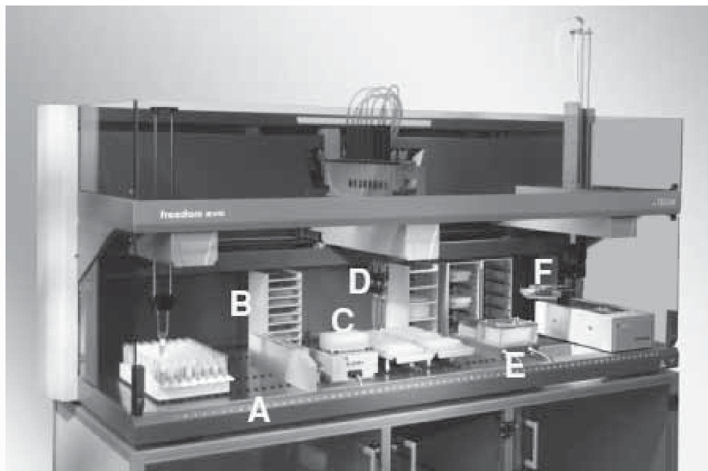
فيما يخص التحليل المتوازي لجميع أوعية الصفيحة، يمكن استخدام قارئ صفيحة ممكنن (Automated plate reader). وهو عبارة عن جهاز مطياف ضوئي (Spectrophotometer) صمم خصيصاً لقراءة الكثافة الضوئية أو التألق في الأوعية المفردة للصفيحة. برمجت هذه الأجهزة للقراءة والتسجيل، على مدى معين من الأطوال الموجية (180–900 نانومتر)، في كل وعاء في الصفيحة وبفترة 15 – 30 ثانية. يمكن استخدام هذه الأجهزة لقياس نمو الخلايا من خلال قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي قدره 600–660 نانومتر، وبالتالي فإنها توفر طريقة سهلة نسبياً وكفوءة لمراقبة نمو الكتلة الحيوية. يمكن كذلك قياس الأكسجين الذائب والرقم الهيدروجيني باستخدام المسابر المتالقة الموصوفة أعلاه. علماً، أن الهز يجب أن يتوقف عند استخدام غالبية أنواع قارئ الصحيفة (plate reader) المتوفرة حالياً، وقد يكون لذلك تأثيرات غير مرغوبة في نمو الخلايا في المزرعة.

4.3.12 المكننة والتشغيل المتوازي

Automation and parallel operation

تعني المكننة استخدام علم الإنسان الآلي (Robotics) وبرامج الكومبيوتر للمساعدة في تنفيذ تجارب زرع الخلايا عن طريق جمع وتحليل أنواع مختلفة من النتائج أوتوماتيكياً. يسمح استخدام المكننة مع الخزانات المخفوقة الصغيرة بالسيطرة على وتسجيل عدة تجارب متوازية (لحد 16 مفاعلاً حيوياً في نفس الوقت) بأسلوب مشابه لجهاز كومبيوتر واحد. يتم التعامل الروتيني مع صفائح العيار الحجمي الميكروي بواسطة النظم الآلية بسبب أبعادها القياسية وبساطة تصميمها. على سبيل المثال، إن استخدام تجارب صفائح العيار الحجمي هو الأسلوب الطبيعي المستعمل في عمليات الغربلة العالية الإنتاجية للأحياء المرشحة لإنتاج الأدوية، حيث يمكن تقييم 250000 مركب مختلف في اليوم الواحد. إن الروبوتات التي تعامل السوائل والمسيطر عليها من قبل أجهزة الكمبيوتر يمكنها التعامل بسهولة مع صفائح العيار

الحجمي الميكروي. في هذه الحالة يمكن للجهاز الآلي في المختبر أن ينفذ مُهمّات أكثر بكثير من جمع النتائج وتحليلها فقط. وبالحقيقية، يمكن مكننة معظم خطوات عملية زرع الخلايا، ويشمل ذلك التلقيح، وتحضير وتوزيع وسط النمو على كل وعاء، والهز، وقياس الكتلة الحيوية وتركيز الأكسجين الذائب، والسيطرة على الرقم الهيدروجيني للوسط. ومن الممكن أيضاً، إضافة خطوة أولية ممكنة لاسترداد الخلايا مثل الترشيح أو النبذ المركزي في حال توقف النمو.



الشكل 4.12: صورة لمنصة آلية تجارية لإجراء غربلة خلايا عالية الإنتاج وتجارب لتحديد الظروف المثلى باستخدام صفائح العيار الحجمي الميكروي. أماكن الفقرات في الطابق (A) محددة في برنامج السيطرة. تجري عملية الزرع على صفيحة هزازة مسخنة (C) ، وتوزع وسائط النمو أو المرق الزرعي باستخدام ماصات مناولة للسائل (D) في صفائح ثانوية موجودة في الخازن (B) . يمكن كذلك إجراء بعض المراحل الأولية من عملية حصاد الخلايا في الصفائح، وأجهزة النبذ الفائق (E) المركزي والترشيح. يستخدم ماسك (F) صفائح العيار الحجمي الميكروي لتحريك الصفائح حول الطابق (Deck) وبين وحدات التشغيل المختلفة وأجهزة التحليل. يمكن لهذه الطريقة إجراء عملية الزرع بالكامل بدون الحاجة إلى تدخل الإنسان ويكون جمع الناتج أوتوماتيكياً بالكامل أيضاً (الصورة مأخوذة من Tecan UK Ltd).

من غير الممكن استخدام مثل هذه المكننة في حالة استعمال الأوعية والأجهزة التقليدية. إن عدم إمكانية التعامل مع الخزانات المخفوقة والدوارق المهزوزة باستخدام الأجهزة الآلية يعود إلى تعقيد هندستها وعدم توفر المنصّات (Platforms) التجارية الملائمة لها.

يجب أن تحتوي المنصة الآلية، المستخدمة في غربلة الخلايا وتحديد الظروف المثلى المعتمدتين على استخدام صفائح العيار الحجمي الميكروي، على المكونات الرئيسية التالية: طابق (Deck) يوفر مساحة لوضع الأجهزة بترتيب معين، ذراع آلي من نوع xyz يحتوي على مواقع لأطراف الماصات (نموذجياً 4–96 ماصة لكل ذراع) لأجل القياس الصحيح للسائل، ذراع آلي ثاني لمسك وتحريك الصفائح حول الطابق، عدة قطع من الأجهزة القابلة للتعامل الآلي (هزازات، قارئات صحيفة) وكومبيوتر للسيطرة على ومراقبة العملية ككل. يظهر الشكل 4.12 صورة لمنصة آلية نموذجية.

4.12 عملية التطوير العالي الإنتاجية

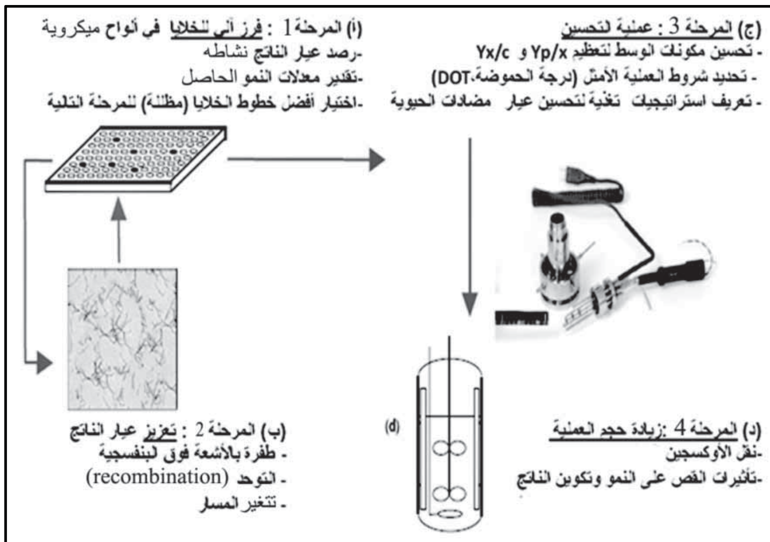
إن العملية النموذجية للتطوير عالي الإنتاجية موضحة أدناه وضمن سياق المراحل الأربع الموضحة بالشكل (1.12): غربلة الخلايا، تحسين الخلايا، عملية تحديد الظروف المثلى وعملية التوسع. لتوضيح عملية التطوير سنستخدم مثالاً لمضاد حيوية جديد ينتج بواسطة كائن مجهري خيطي معزول من البيئة الطبيعية. يعطي الشكل (5.12) فكرة عامة عن عملية التطوير. يعتمد تصنيع المضاد الحيوي على عدة عوامل: وراثية (مستوى التعبير لأنزيمات رئيسية)، فسلجية (مثل الدفق الكربوني)، وظروف بيئية (مثل تركيز الأكسجين). يجب أن نأخذ بعين الاعتبار جميع هذه العوامل خلال عملية تطوير مزرعة الخلايا.

1.4.12 غربلة خط الخلايا Cell-Line screening

الهدف من غربلة خطوط الخلايا هو تشخيص أحسن خط خلايا بري متوفر لإنتاج مركب معين نشط حيوياً أو أنزيمياً. إن خطوط الخلايا المتاحة للإدراج في عملية الغربلة الأولية تأتي إمّا من مكتبات الخلايا الموجودة في المختبر (In-house cell libraries)، أو من المراكز التجارية لتجميع الزرعات (Culture collection). إضافة إلى ذلك، يمكن استخدام قواعد معلومات معينة، مثل تلك التي تتعامل مع المسارات الأيضية الميكروبية، لتشخيص خطوط خلايا لها القدرة على

القيام بتحولات كيموحيوية معينة، أو تأليف مركبات معينة. والبديل عن ذلك هو إمكانية تشخيص خطوط خلايا جديدة كلياً من خلال أخذ نماذج من الطبيعية وإغنائها. ويشار إلى هذه الطريقة غالباً بمصطلح التنقيب الحيوي (Bioprospecting). وبغضّ النظر عن المنشأ، فإن عدد خطوط الخلايا التي يمكن إدراجها في عملية الغربلة الأولية يتراوح بين عشرات إلى عدة آلاف. إن هذه الأعداد الهائلة هي أحد التحديات الرئيسية في هذه المرحلة الأولى من عملية التطوير. وهناك عامل آخر له نفس الأهمية وهو اختيار وتوظيف أداة تحليل مناسبة. فعلى الرغم من أن التقدير الدقيق للمنتوج المتكون لا يكون أساسياً في هذه المرحلة، إلا أن أي تقنية تحليلية مستخدمة يجب أن تكون سريعة، وأن تعطي استجابة إيجابية أو سلبية واضحة لكل خط خلايا يتم تقييمه.

لأجل التعامل مع هذا العدد الكبير خلال طريقة الإنتاج العالي غالباً ما تستخدم طريقة صفائح العيار الحجمي الميكروي الممكننة بالكامل لزراعة خطوط الخلايا وتقييمها. إن انخفاض مستوى المعلومات الناتجة (تكون النتائج أقل كما يتم الحصول عليها في بيئة هندسية غير معروفة بشكل جيد) لا يكون ذا أهمية كبيرة في هذه المرحلة من عملية التطوير.



الشكل 5.12: نظرة عامة لعملية عالية الإنتاجية لانتقاء خط الخلايا ولتحسين وتحديد الظروف المثلى لنموه في استراتيجية تُستخدَم لتطوير إنتاج مضاد حيوية جديد.

البولي كيتايد (Polyketides) هي مجموعة من مضادات الحيوية ذات فعالية مهمة ضد الأحياء الحجمي الميكروية. أفضل الأمثلة المعروفة من هذه المجموعة هو الايرثرومايسين. معظم مضادات الحيوية المتوفرة تجارياً من هذه المجموعة هي منتجة بواسطة أنواع الستربتومايسيس *(Streptomyces sp)* وخطوط الخلايا الميكروبية الخيطية ذات العلاقة التي تتواجد بصورة طبيعية في التربة. خلال المرحلة الأولى من التطوير، يتم الحصول على مجموعة من خطوط الخلايا البرية التي قد تنتج مضادات حيوية، من نوع البولي كيتايد، ذات فعالية ضد ميكروبية مرغوبة – يزرع كل من هذه الخطوط بعد ذلك في وسط زرعي معرّف كيمياوياً، إما على أطباق الأغار (Agar) أو في مزارع سائلة في أوعية صغيرة، وكما موضح بالشكل 5.12 (أ). يمكن تحديد خطوط الخلايا التي تنتج مضاداً حيوياً ذا فعالية عالية باستخدام فحص الانتشار في الأجار مثل فحص kriby – Bauer حيث يقاس منع النمو لكائن مجهري حساس نتيجة لوجود المضاد الحيوي.

2.4.12 تحسين خط الخلايا Cell-line enhancement

بعد مرحلة الغربلة الأولية، يتم اختيار عدد من خطوط الخلايا الواعدة لاستخدامها في المرحلة التالية من عملية التطوير وهي تحسين خط الخلايا. يمكن في هذه المرحلة استخدام تقنيات حيوية جزيئية مختلفة (كما موضح بالفصلين الرابع والخامس) لتحسين أداء خطوط الخلايا البرية، وكما هو موضح بالشكل 5.12 (المرحلة 2). يمكن استخدام عدة تقنيات مثل الكلونة (Cloning) وإعادة الارتباط (Recombination) والتطفير الموضعي الموجه، والتطور الموجه، وهندسة المسار الأيضي. إذا كانت المعلومات الوراثية المتوفرة عن خطوط الخلايا الواعدة قليلة، فإن الطريقة البديلة للتحسين هي استخدام التطفير العشوائي بتعريض الخلايا إلى الأشعة فوق البنفسجية، أو العوامل الكيمياوية. يعتمد اختيار التقنية الأكثر ملائمة على الحالة المدروسة. على سبيل المثال، أنزيم هدام يمكن استعماله كمحفز حيوي صناعي يعزل أولاً من خط خلايا بري تم تشخيصه خلال مرحلة الغربلة. وبعد ذلك يتم استنساخه وتعبيره في مضيف معروف ومدروس بشكل جيد

مثل *E. Coli*. يمكن بعد ذلك تحسين الفعالية الخاصة للأنزيم بواسطة التطور الموجه. يقدر عدد خطوط الخلايا المستنسخة التي يمكن إنتاجها بهذه الطريقة عادة بعشرات الآلاف. لذلك، وبسبب الأعداد الكبيرة لخطوط الخلايا الجديدة الواجب تقييمها، فإن تقنية صفائح العيار الحجمي الميكروي غالباً ما تستخدم هنا أيضاً.

الإطار 2.12 إنتاج مضاد حيوية جديد: المرحلة 2

تخضع خطوط الخلايا التي أظهرت قابلية جيدة والتي شخصت خلال مرحلة الغربلة الأولية إلى مجموعة من التقنيات لأجل زيادة إنتاج مضاد الحيوية، وكما هو موضح بالشكل 5.12 (المرحلة 2). إن مرحلة التحسين تكون ضرورية دائماً، وذلك لأن خطوط الخلايا البرية تكون بطيئة النمو عادة وذات منخفض للمضاد الحيوي نسبة إلى الكتلة الحيوية. غالباً ما تستخدم تقنيات بسيطة، مثل التطفير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية، لتحسين إنتاج المضادات الحيوية من الـ *Streptomyces* والأنواع الأخرى ذات العلاقة. علماً أن من الممكن كذلك استخدام تقنيات متطورة في عمليات تشخيص وتحسين أنزيمات رئيسية والتدفقات في مسارات التصنيع الحيوي. استخدمت تقنية التطور الموجه في تحسين خصوصية الأنزيمات واستخدمت الهندسة الأيضية لتحديد وإيجاد الظروف المثلى لدفق الكربون من مصادر التغذية وصولاً إلى المنتوج. علاوة على ذك، يمكن استخدام هذه التقنيات لتغيير خصوصية الأنزيم، وبالتالي تغيير شكل المضاد الحيوي للحصول على مضادات حيوية جديدة تتجاوز آليات المقاومة التي تظهرها البكتريا المعينة.

مهما تكن التقنية المستعملة، فإن عدد خطوط الخلايا المحورة سيكون هائلاً مرة أخرى، وبالتالي فمن الأفضل إجراء زراعة وفحص كل من هذه الخطوط باستخدام صفائح العيار الحجمي الميكروي وباستخدام منصّات آلية. تنقل المستعمرات المفردة النامية على أطباق أغار آلياً إلى أوعية فردية في الصفيحة التي تحتوي على الوسط الزرعي، ثم تحضن بدرجة 30−25°C لمدة خمسة إلى سبعة أيام. يستعمل الجهاز الآلي، الذي يلتقط المستعمرات، كاميرا رقمية لتكوين صورة لمكتبة الخلايا على طبق الأجار في صفيحة المعيار الحجمي الميكروي المجهزة للزرع. تكون جميع

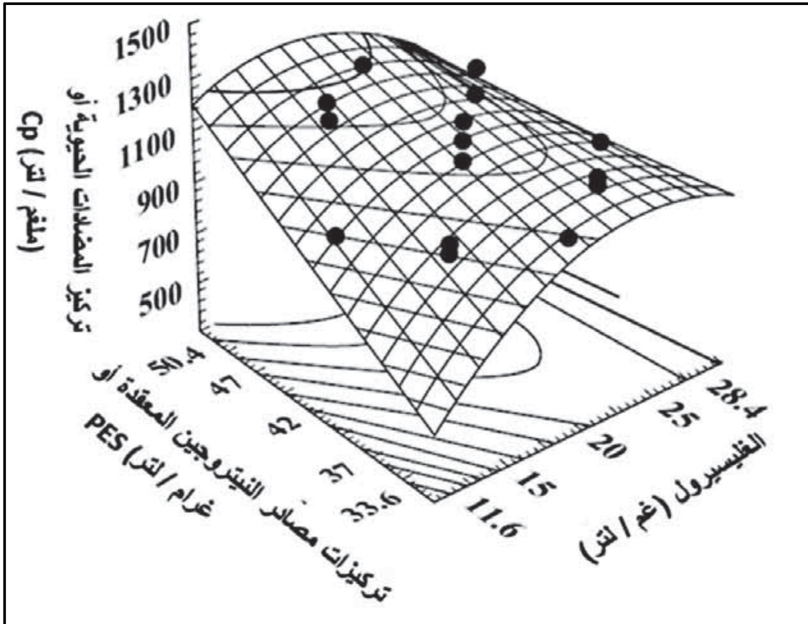
مراحل الزرع ممكننة. تجري عملية انتقاء خطوط الخلايا المحسنة، التي تعطي أعلى تركيز من المنتوج، إما باستخدام التحليل في الموضع (In-situ analysis) ، مثل استخدام المطياف الضوئي ذي الأشعة تحت الحمراء القريبة (Near-infrared spectroscopy) الذي يعمل بطريقة بحيث لا يلامس الناتج، أو باستخدام فحص معتمد على تصدير لوني متكامل (Integrated chromatography). يتم انتقاء أفضل خطوط الخلايا لإخضاعها لدورات أخرى من التحسين.

3.4.12 تحديد الظروف المثلى للعملية Process optimization

حالما يتم تشخيص عدد محدد من أفضل خطوط الخلايا إنتاجاً، وعادة ما تكون بين 5 إلى 10 خطوط، تبدأ المرحلة التالية، وهي تحديد الظروف المثلى للنمو وتكوين المنتوج لكل خط من هذه الخطوط. إن الأهداف الخاصة لهذه المرحلة من التطوير تشمل: (أ) تحديد التركيب الأمثل للوسط الزرعي، (ب) تحديد المعايير الحركية لعملية النمو وتكوين المنتوج (ج) استحداث طريقة محددة لعمليات الإنتاج الموسع، مثل إيجاد الظروف المثلى للرقم الهيدروجيني للمزرعة، ودرجة الحرارة، ومستوى الأكسجين الذائب، واستراتيجيات التغذية الخاصة. إن القياسات الدقيقة تكون أساسية في هذه المرحلة لأجل توفير معلومات كافية لعملية توسع ناجحة. في حالة الطرق التقليدية، تجري هذه التجارب بالتأكيد باستخدام مفاعلات حيوية مجهزة بالكامل ومعروفة بشكل جيد وبأحجام تتراوح بين 1 و 20 لتراً. أما في الطرق عالية الإنتاج، فيفضل استخدام مفاعلات حيوية مخفوقة مصغرة تعمل بالتوازي.

أما بالنسبة إلى دراسات النمو، فإن العدد الكبير من مصادر الكربون والنتروجين التي يمكن اختبارها، والمدى الواسع من التراكيز التي يمكن أن تجرّب لكل منهما، يعني أن عدد التجارب المطلوبة سيكون، مرة أخرى، كبيراً. ولقد تم تطوير وسائل لتصميم التجارب، فعلى سبيل المثال، طورت برامج، تستند إلى طرق إحصائية، تهدف إلى تقليل عدد التجارب التي يجب إجراؤها، وذلك من خلال سماحها قياس تغاير عدد من العوامل في الوقت عينه. والمعاملات

الإحصائية للنتائج ضمن هذه البرامج يمكن أن تساعد في تشخيص تفاعلات معينة بين العوامل المدروسة، التي عادة ما يتم تجاهلها في التجارب التقليدية بسبب اعتمادها على تغير عامل واحد فقط في كل مرة. مثال على التفاعل بين تراكيز مصادر الكربون والنتروجين في عملية إنتاج المضاد الحيوي بواسطة *Streptomyces clavuligerus* موضح بالشكل (6.12).



الشكل 6.12: استخدام تصميم حديث للتجارب في عملية تحديد الظروف المثلى لتراكيز مصادر الكربون والنتروجين في عملية إنتاج مضاد حيوية بواسطة *Streptomyces clavuligerus*. يظهر المنحنى زيادة في تركيز مضاد الحيوية (Cp) مقابل عدة تراكيز من الجليسرول (مصدر كربوني) ومستخلص فول الصويا (PES، مصدر نتروجيني معقد).

تظهر تقوسات المنحنى العلاقة القوية بين مستويات الكربون والنتروجين في المرق الزرعي للإنتاج الأمثل للمضاد الحيوي. (استخدم الشكل بموافقة من:

E.S. Gouveia, A. Baptista – Beto, A. C. Badino, Jr., and C. O. Hokka, "Optimisation of Medium Composition for Clavulanic Acid Production by Streptomyces Clavuligerus." *Biotechnology Letters*, vol. 23 (2001), pp. 157-161.

4.4.12 التوسع Scale - up

التوسع (Scale-up) هو طريقة هندسية تعمل على تحويل عملية زرع الخلايا إلى عملية زرع أحجام كبيرة منها بنجاح. تشمل عملية التوسع عادة زيادة حجم المزرعة من مستوى المختبر أو المصنع الريادي (1−1000 لتر) إلى المستويات التصنيعية، التي قد يصل حجمها إلى عدة مئات الأمتار المكعبة.

إن مثل هذه الطريقة لا يمكن معالجتها بالطرق العالية الإنتاج بسبب الكلفة العالية للوسط الزرعي وتكاليف العمال المرتبطة بكل تجربة، مع أن الطرق العالية الإنتاج هذه هي جزء أساسي في عملية التطوير.

الإطار 3.12: إنتاج مضاد حيوية جديد: المرحلة 3

بعد تشخيص وهندسة خط خلايا منتج لمضاد حيوية جديد وبمواصفات مرغوبة، تستخدم خزانات مخفوقة مصغرة بحجم 100 ml لتحديد الظروف المثلى للنمو، وكما موضح بالشكل 12−5 (المرحلة 3). لغرض إنتاج مضادات حيوية جديدة من نوع البولي كيتايد يجب تحديد العوامل الخاصة لمعدل النمو والإنتاج للكتلة الحيوية والمادة الأولية وذلك باستخدام مدى من أوساط النمو وظروف تشغيل مستقلة. علاوة على ذلك، يمكن الحصول على مدى النمو وتكوين المنتوج مع الوقت لأن كلتا العمليتين نادراً ما تحدثان بنفس الوقت. الأهداف المرجوه هي انتقاء أفضل توليفة لمصادر الكربون والنتروجين وأفضل طريقة للتغذية. مصادر معقدة للكربون والنتروجين مثل سائل منقوع الذرة وطحين الصويا على التوالي هي مختارة لأنها رخيصة. وعلى الرغم من أن النمو فيها بطيء، إلا أن المنتوج يكون عالياً. يتم كذلك في هذه المرحلة من تطوير العملية تحديد نظم التغذية بالكربون والنتروجين أثناء تطور إنتاج المضاد الحيوي.

5.12 الخلاصة Summary

إن الوقت المتسغرق لتطوير وتقييم الجدوى الاقتصادية لعملية زرع الخلايا هو شيء أساسي للنجاح التجاري. وخلال الفترة المحصورة بين الاكتشاف الأولي لمركب جديد فعال حيوياً (المرحلة 1) ومرحلة دفع المنتوج إلى الأسواق (بعد المرحلة 4)، يستخدم المشروع مصادر الشركة الثمينة، على شكل عمال ومواد، ولكنه لا يعطي أرباحاً. وعليه فمن الأفضل أن تكون هذه الفترة أقصر فترة ممكنة.

من الواضح أن تطوير **العملية الصناعية** يتطلب إجراء عدد كبير من التجارب لغرض غربلة خطوط الخلايا البرية وانتقاء وتهيئة الظروف المثلى لخط خلايا مفرد وتصميم عملية زرع ناجحة وفعالة وبأحجام كبيرة. وبهذا فإن أي طريقة تعمل على اختزال الوقت المطلوب لإجراء هذه التجارب سيقلل من المخاطر التجارية ويزيد من القابلية الربحية للعملية. إن استخدام التقنيات عالية الإنتاجية في المراحل 1 و 2 و 3 لتطوير عملية الزرع يعمل على اختزال الوقت المستغرق للحصول على معلومات كافية عن العملية، وبالتالي يزيد من فرص النجاح التجاري بشكل كبير.

6.12 قراءات إضافية Further reading

Buchs, J. “Introduction to Advantages and Problems of Shaken Cultures.” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 7 (2001), pp. 91-98.

Chartrain, M., P. M. Salmon, D. K. Robinson, and B. C. Buckland, “Metabolic Engineering and Directed Evolution for the Production of Pharmaceuticals.” *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 11 (2000), pp. 209-214.

Devlin, J. P. *High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances*. New York: Marcel Dekker, 1997.

Hilton, M. D. “Small-scale Liquid Cell Cultivations.” in: A. L. Demain and J. E. Davies, eds., *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1999.

Kumar, S., C. Wittmann, and E. Heinzle, “Minibioreactors.” *Biotechnology Letters,* vol. 26 (2004), pp. 1-10.

Lye, G. J., P. Ayazi-Shamlou, F. Baganz, P. A. Dalby, and J. M. Woodley, “Accelerated Design of Bioconversion Processes Using Automated Microscale Processing Techniques.” *Trends in Biotechnology,* vol. 21 (2003), pp. 29-37.

الفصل الثالث عشر

صناعة التقانة الحيوية

The Business of Biotechnology

جيسون روشتون و Jason Rushton and

كريس إيفانز Chris Evans

مرلن للعلوم الحيوية المحدودة، المملكة المتحدة Merlin Biosciences Ltd, UK

1.13 المقدمة Introduction

التقانة الحيوية هي إحدى طرائق استغلال العمليات الحيوية لأغراض صناعية وأخرى غيرها. سنتطرق في هذا الفصل إلى تطور صناعة التقنية الحيوية منذ بداية ظهورها – شركة التقانة الحيوية الناشئة مروراً بعملية النضج والتطوير لتكوين شركات متكاملة تساهم بمنتجات على المستوى العالمي – وما هي العوامل المساهمة في نجاح وفشل التطبيقات التجارية للعمل والمشروحة في مكان آخر من هذا الكتاب.

ظهرت هذه الصناعة في عقد السبعينيات من القرن العشرين أولاً في الولايات المتحدة الأمريكية (فرصة خُلِقَت عن طريق توفر موارد فكرية وتجارية موروثة آزرتها بيئة رأسمالية قوية)، وبعدها في أوروبا وآسيا كذلك. هدفنا في هذا الفصل هو إعطاؤك إحساساً بما تحتاجه، وما تحتاج عمله، إذا كنت ستبدأ ببناء شركة تقانة حيوية وتديرها بنجاح.

2.13 ما هي أهداف استخدامات التقانة الحيوية؟

What is biotechnology used for?

كمقدمة في هذا الباب سنراجع معاً مقاصد الشركات المستخدمة للتكنولوجيا الحيوية، لنستقرئ أسباب نجاح بعضها، وإخفاق الأخرى.

1.2.13 التطبيقات: في الطب The applications: medicine

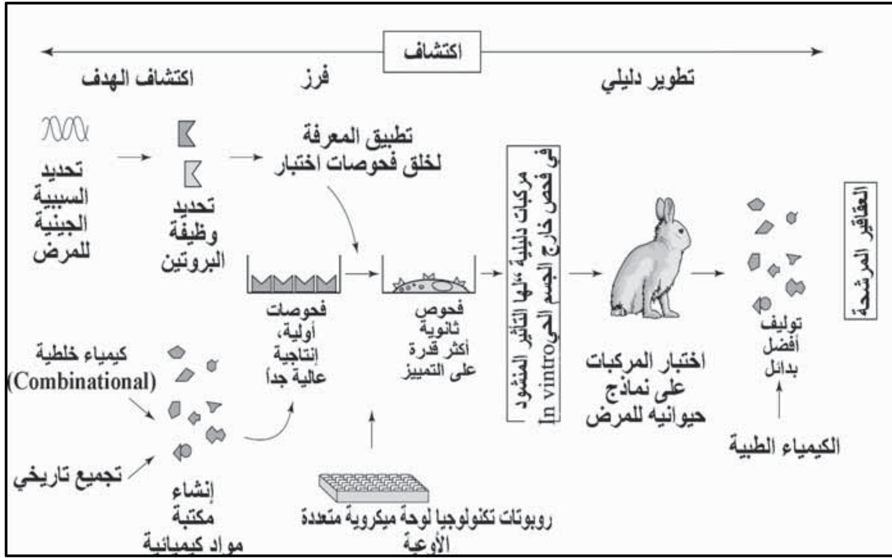
تم توجيه جزء مهم من الاستثمارات في التقانة الحيوية حول الرعاية الصحية، وبالذات نحو اكتشاف أدوية جديدة. من المعروف أن براءات الاختراع توفر حماية قانونية لضمان بيع دواء فعّال جديد بأسعار عالية ولفترة زمنية معينة تحددها براءة ذلك الاختراع، التي تمنع الآخرين في نفس الزمن من صناعة وبيع هذا الدواء بأسعار منافسة أو منخفضة. ولكن حالما تنتهي فترة الحماية المحددة في براءة الاختراع، يصبح بالإمكان تصنيع الدواء على شكل منتوج عام، وبالتالي ستتدهور وبسرعة مبيعات وأرباح الشركة المنتجة الأصلية. وهكذا لا تبقى فترات نفاد براءات الاختراع إلى ما لا نهاية: فأقصى فترة نفاد لا تزيد على 20 عاماً، علماً أن الزمن المحدد لها في الولايات المتحدة هو 17 سنة. وبهذا إذا استغرق تطوير الدواء 15 سنة، فإن براءة الاختراع سوف تحمي صانع المنتوج من المنافسة لمدة خمس سنوات إضافية فقط. وهذا يعني أن على المخترع الأصلي للدواء اختراع دواء جديد كل خمس سنوات (والأفضل أقل من ذلك) إذا كان يريد بيع أدوية ذات قيمة عالية، وبالتالي بربحية عالية، وبهذا فإن اكتشاف أو اختراع أدوية جديدة هي مسألة مهمة للاستراتيجية التجارية للعديد من الشركات الصيدلانية الكبيرة. وبالحقيقة إن الشركات الجبارة (Super-companies) المتكونة عن طريق دمج عدة شركات مع بعضها بعضاً، مثل شركة Glaxo Smith Klein وشركة Astrazeneca يجب أن تطرح عدة أدوية جديدة في كل سنة لكي تحافظ، فقط، على موقعها التنافسي، وعلى سعادة حاملي أسهمها. وتدور معظم مواضيع هذا الكتاب حول تقنيات الصناعة الحيوية، وليس حول تطبيقها في اكتشاف الأدوية. ولهذا سنلخص هنا كيف يجري العمل على اكتشاف الدواء. إن أكثر

الطرق اتباعاً في ذلك هي الطريقة الموضحة بالشكل (1.13). فهنالك العديد من تقنيات الاكتشاف بإمكانها تشخيص الهدف الجزيئي (Molecular target) ومن ضمنها تقنيات في مجالات علم الجينوم (Genomics)، وعلم البروتينات (Proteomics)، والتصوير البلوري باستخدام الأشعة السينية (X-ray crystallography) والتصميم الحسابي (Computational design). إن الهدف المطلوب هو كيان جزيئي له فعالية مهمة في مرض ما. تبدأ بعد ذلك عملية الاكتشاف لتوليد أو إيجاد مركب جزيئي صغير يتداخل مع تأثيرات ذلك الهدف. إن الأسلوب المتبع في هذه العملية يكون غالياً، حيث إن واحداً فقط من كل 13 دواءً مكتشفاً وصلوا إلى مرحلة ما قبل التجارب السريرية سوف يصل إلى مرحلة الإطلاق إلى السوق. إضافة إلى هذه المشكلة، فإن تكاليف التطوير قد زادت بشكل معنوي خلال العقد الأخير بسبب المتطلبات التنظيمية المتشددة وحالات الأمراض المعقدة ومعدلات الاستنزاف العالية. فحسب دراسة لمركز تافتس (Tufits) لدراسة وتطوير الأدوية، كان معدل كلفة تطوير الدواء في عام 1987 يساوي 231 مليون دولار أمريكي. وعند إجراء نفس الدراسة في عام 2001 بلغت التكالف 802 مليون دولار أمريكي، وحتى لو أخذ التضخم المالي بعين الاعتبار فإن هذه الزيادة لازالت هائلة. إن التكاليف النموذجية لبرامج اكتشافات الأدوية موضحة بالجدول (1.13)، وإن صورة عائد المخاطر (Risk return profile) تعني أن الصناعة الصيدلانية تنفق أموالاً طائلة على البحث والتطوير، التي ينتج منها أشياء لا تعمل. لذلك فليس من المدهش أن تكون هذه الشركات مستعدة لدفع مبالغ كبيرة إلى شركات التقانة الحيوية التي يمكنها تزويدهم بمعلومات علمية أو تقنيات تعمل على:

- تحسين المعرفة بالمرض (وبهذا تقلل من الخطر الموروث في الطريقة).
- زيادة من كفاءة العملية في الاكتشاف أو التطوير أو في المراحل السريرية.
- إعطاء فائدة تنافسية في المجالات أعلاه.

إنه نشاط مستمر يبتدئ من البحث الطبي الحيوي الأساسي إلى التطوير التجاري للدواء، وإن صناعة اكتشاف الدواء بالتقانة الحيوية تقع في منتصف هذا

النشاط. وبهذا فإن بعض الشركات هي بالأساس امتدادات تطبيقية للمجاميع الأكاديمية، في حين تكون شركات أخرى متكاملة تماماً، ولا يمكن تمييزها من شركات الأدوية الصغيرة. وهنالك شركات أخرى تقع في الوسط وتوفر مهارات أو خدمات تقنية خاصة مثل علم الجينوم (Genomics)، أو الكيمياء الاندماجية (Combinatorial Chemistry)، أو تقانات التصميم الجزيئي (Molecular design technology). إضافة إلى ذلك خلال النضال المستمر للوصول إلى نجاحات أكبر واختزال الكلفة، تعمل بعض الشركات على تغيير ترتيب حدوث هذه الخطوات وبشكل جذري. على سبيل المثال، إنجاز بعض نواحي التطوير التقليدي (الشكل 2.13) كجزء من عملية الاكتشاف (الشكل 1.13).



الشكل 1.13: مسار اكتشاف الدواء. الموديل الحالي لعملية اكتشاف الدواء. (تجري العملية من اليسار إلى اليمين). تبدأ العملية باكتشاف الجين الهدف بواسطة الطرق الوراثية، ومن ثم اكتشاف البروتين، مع توليد مجموعة متباينة من الكيمياويات من مكتبات متخصصة أو من الكيمياويات المتجمعة خلال تاريخ عمل الشركة. تفحص المواد الكيمياوية لتعيين قابليتها على منع (أحياناً تحسين) عمل البروتين والهدف إجراء فحص أولي باستخدام التقنية عالية الإنتاج، ويكون عادة هناك فحص ثاني أكثر تعقيداً، لفحوص الوظائف الخلوية. النتيجة هي مركبات دليلية تختبر باستخدام حيوانات مختبرية حساسة للمرض، ويتم اختيار خصائصها الصيدلانية، وإذا كانت هناك ضرورة يتم تحويرها بواسطة الكيمياء الطبية الموجهة لإنتاج الدواء المرشح.

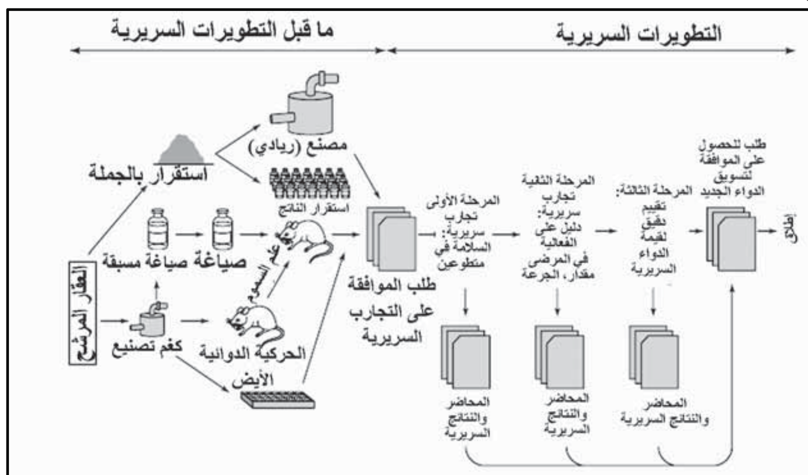
الجدول 1.13: أرقام مقارنة لشركات التقانة الحيوية: عدد شركات التقانة الحيوية في مختلف الدول والعاملين فيها ونفقات البحث والتطوير (R&D) مقارنة بعدد سكان هذه الدول

البلد	عدد السكان (بالمليون) متوسط منتصف التسعينيات	عدد شركات التقانة الحيوية (1998)	العدد الكلي للمستخدمين	المبلغ الكلي للبحث والتطوير في مجال التقانة الحيوية (مليون يورو)
الولايات المتحدة	260.5	127.4	140.000	8268
المملكة المتحدة	57.6	245	39.000	1910
ألمانيا	80.9	165		
فرنسا	57.6	141		
السويد	8.7	85		
بقية أوروبا والدول الإسكندنافية	175.3	400		

تستخدم المواد التشخيصية (Medical diagnostics) كأدوات لتشخيص المرض والظروف المختلفة للمريض. ولهذه المواد ديناميكية مختلفة جداً في مفهوم تطويرها وتسويقها. فمن الصعوبة على الباحث الأكاديمي اكتشاف وتطوير دواء جديد، مع أن عملية اكتشاف علامة (Marker) تشخيصية جديدة للتفريق بين المرضى والأصحاء هي أكثر سهولة له، وفي العديد من الحالات لا تحتاج إلى رأس مال كبير. إن العوامل الرئيسية المحددة في تسويق وتجارة مواد التشخيص هي في جعلها موثوقة وبسيطة بحيث يمكن استخدامها بشكل واسع، والحالة المثلى هي في إمكانية إجرائها بواسطة ماكينات أوتوماتيكية بحيث تنتفي الحاجة إلى استخدام تقنيين مهرة. بالإضافة إلى ذلك، وفيما أن النتائج الناشئة عن استخدام المواد التشخيصية قد تستعمل في اتخاذ قرارات مهمة، إلا أنه يتوجب أن يصادق على هذه المواد من قبل السلطات التنظيمية وأن تكون ذات نوعية عالية. نتيجة لذلك، فإن عدداً قليلاً من الشركات تسيطر على صناعة المواد التشخيصية، وتملك هذه الشركات قابليات كبيرة في التسويق والتوزيع،

وعادة ما تكون هذه المواد التشخيصية مصممة لاستخدامها مع الأجهزة الأتوماتيكية التي تنتجها الشركات نفسها، والقادرة على أداء مدى واسع من الفحوصات. أما الشركات الصغيرة فإنها تستطيع أن تجد موطئ قدم في هذا السوق من خلال اكتشافها لأشياء وحيثيات متخصصة ومبدعة.

إن الأدوية المكتشفة عن طريق استخدام معلومات الجينوم قد تغير هذا الأمر، لا سيما وأن المزيد من الأدوية استهدف اعتماداً على الفحوص التشخيصية التي طورت خصيصاً لهذه الأدوية وهي تباع معاً (فكرة يطلق عليها ترادف – RXDX tandem - RxDx). وقد تأخذ تشكيلة المادة التشخيصية – الدواء المستقبلية بالاعتبار خصوصية جينوم المريض، واختبار نمط استجابة جيناته لمرض معيّن تمهيداً إلى اعتماد طريقة المعالجة. أما من ناحية الوقاية من المرض، فإن المواد التشخيصية قد تشير إلى زيادة في خطر الإصابة بأمراض معينة، كأمراض القلب مثلاً، مما يسمح بتغير نمط الحياة والمعالجة بالأدوية لسنوات قبل ظهور أي أعراض يمكن الكشف عنها. إن استخدام المواد التشخيصية قد يعري كذلك نواحي أخلاقية: مثلاً، إذا شخصت بأنك معرض إلى الإصابة بمرض قلب أو مرض الزهايمر بسنين قبل حصول المرض، فهل يا ترى ستحصل على تأمين صحي أو تأمين على الحياة؟.



الشكل 2.13: مسار تطوير الدواء. نموذج حالي لتطوير الدواء. تسري العملية من اليسار إلى اليمين. يختبر المركب من حيث الأيض، والسمية، والوفرة الحيوية والصفات الصيدلانية الأخرى

تقليدياً في الحيوانات المختبرية، إلا أن استخدام الاختبارات خارج الخلايا وفي الزجاج (in vitro) هي في ازدياد. تدخل المركبات الناجحة بعدئذٍ سلسلة من التجارب السريرية للحصول على سجل شامل للمعلومات يستخدم في تقديم طلب الحصول على موافقة لتسويق المنتوج كدواء.

2.2.13 التطبيقات: الغذاء والزراعة

Applications: food and agriculture

يعتبر الغذاء والزراعة من الناحية الاقتصادية أكثر أهمية من الرعاية الصحيحة، حتى في الدول الغربية، ومن الواضح أنهما ذات أهمية أكبر لبقية دول العالم. ومع ذلك فإن هذين المجالين لم يجتذبا العديد من شركات التقانة الحيوية. والسبب الرئيسي في ذلك، هو عدم إمكانية بيع غذاء جديد بسعر 1000 دولار أمريكي للوجبة بنفس الطريقة التي يمكن فيها بيع الدواء الجديد بـــ 1000 دولار أمريكي للقارورة الواحدة. كما أن الغذاء موضوع حساس للسعر: فكلما زاد السعر قلّ البيع. وفوق سعر معيّن سوف لا تستطيع بيع أي شيء (تحديد سعري). وعليه، من الصعوبة تبرير إنفاق كمية كبيرة من المال على تطوير مواد غذائية جديدة لأن تلك الأموال لا يمكن استعادتها من خلال ثمن مرتفع الجديد. ولعل البديل الأجدى هو تربية وتأصيل النباتات (Plant breeding)، حيث يمكن تعويض كلفة توليد سلالة نباتية جديدة عن طريق بيع كمية كبيرة جداً من البذور، وبسعر عالٍ، أو المنتوج المستحصل، أو من خلال التوفير الذي يمكن الحصول عليه أثناء إنماء المحاصيل الجديدة (استخدام أسمدة أو مبيدات أعشاب أقل). مبدئياً، يمكن استرجاع كلفة تطوير نبات محصول هجين أو متعدي للجنس (Transgenic) ومقاوم للحشرات (عملية تكلف عشرات إلى مئات الملايين من الدولارات) عن طريق وضع سعر إضافي على البذور: وسيدفع المزارعون سعراً أعلى لشراء هذه البذور لأنهم سينفقون أقل على المبيدات الحشرية.

إن هذا المنطق الاقتصادي جعل تقنيات التكاثر الحيواني ذات قيمة أيضاً، إما عن طريق إنتاج حيوانات هجينة أو استنساخها كما حدث مؤخراً. إن القيمة العلمية والتجارية لهذا الاستنساخ توضحها الإثارة التي رافقت ولادة النعجة المستنسخة دولي (Dolly) عام 1997، فإن دولي لم تكن ناتجاً بحد ذاتها، وإنما

كانت تمثل برهاناً لمفهوم يوضح التقنية التي يمكن أن تنتج منتوجاً صناعياً مربحاً وواسع النطاق. ماتت دولي في شباط عام 2003 وبعمر ست سنين بسبب مرض شائع يسمى Sheep Pulmonary Adenomatosis (SPA) وهو سرطان رئوي يسببه فيروس، وعلى الرغم من أن هذا كان رحيلاً مبكراً بالنسبة إلى الأغنام (يمكن أن تعيش لغاية 12 سنة أو ما يقاربها)، إلا أنه لم يكن هناك أدلة تشير إلى أن استنساخها لعب دوراً مهماً في هذا الموت المبكر.

كانت التقنية الحيوية ذات التوجهات الإنتاجية في الزراعة ناجحة جداً عندما كانت تركز على القيمة المضافة للناتج النهائي (وليس على زيادة عموم الناتج). ومن البرامج النموذجية للتقنية الحيوية في الغذاء والزراعة استخدام الأنزيمات المهندسة وراثياً في معالجة الأغذية (يمكن أن تكون القيمة المضافة تطوير نكهات غذاء أكثر جاذبية) والانتقال الجيني (Transgenic) لإطالة العمر السوقي للفاكهة والخضر المهجنة (كانت أولى هذه المنتوجات الطماطم من نوع FlavrSavr)، والإضافات البكتيرية (Bacterial silage) للعلف وتحفيز تكون العقد في البقولات لزيادة الإنتاجية.

إن خلق مثل هذه الأغذية التي تسمى أغذية فرانكشتاين (Frankestein food) قد ولّدت الكثير من النقاشات السياسية والأخلاقية، واختلفت وجهات النظر حول إمكانية استخدامها ودرجة أمانها وسلامة استهلاكها كثيراً بين البلدان والحكومات، وبين الناس ككل. وأحياناً تكون الآراء حول هذا الموضوع قوية ومتعصبة، نتج منها نشاطات غير قانونية عندما دمرت المحاصيل التجريبية أو التجارب أثناء التظاهرات بواسطة المتظاهرين. ولكن من الناس في مختلف مناطق العالم من يعتبر أن الطماطم المهندسة وراثياً لذيذة وليس لها مخاطر صحية! بالرغم من كل ذلك، فإن كلفة المواد الخام في العديد من المنتوجات المستهلكة تمثل جزءاً صغيراً من كلفة التغليف والنقل والخزن والبيع: على سبيل المثال، في حالة فحص الحمل (Pregnancy test) الذي تستطيع شراءه من الصيدلية مباشرة، فإن معظم تكاليف التصنيع لا تكمن في كواشف الجسم المضاد، ولكنه في التغليف البلاستيكي.

وهذا بدوره يمثل جزءاً بسيطاً من كلفة الخزن والنقل لمواد الفحص المعلبة. وعليه، فإن نواتج التقنية الحيوية يجب أن تضيف قيمة استثنائية لكي تكون جديرة بالتطوير.

هناك مجالان آخران للتقنية الحيوية لهما تطبيقات ناجحة في علوم النبات وكلاهما تطبيقات لصناعات قائمة ومعروفة بشكل جيد. المجال الأول هو استخدام الأنزيمات، وبدرجة أقل، الكائنات المجهرية، في التحضيرات الغذائية. أما المجال الثاني فهو البستنة (Horticulture)، لتطوير أنواع جديدة من نباتات الزينة التي أصبحت أحد التطبيقات الرئيسية في مجال البستنة. يمكن أن يتحمل البستاني استخدام مستويات أعلى المبيدات الحشرية، كما يمكنه تحمل فشل المنتوج أكثر بكثير مما يستطيع المزارع تحمله: حيث إن المطلوب هو أن يبدو محصولهم جميلاً فقط. أما بالنسبة إلى نباتات المحاصيل فقد أثبتت هذه التقنيات نجاحاً محدوداً في الإنتاج الموسع، على الرغم من أن هذه النباتات استخدمت كجزء من الغطاء للتقنيات المستخدمة في تربية وتأصيل النباتات.

3.2.13 التطبيقات: الصناعات الأخرى

Applications: other industries

مبدئياً، يمكن للعديد من الصناعات الأخرى الاستفادة من التقنية الحيوية، وربما أدخلت هذه التقنيات في عملياتها. فعلى سبيل المثال تستخدم الصناعات النسيجية التقنية الحيوية بشكل واسع، فهي تعامل المنسوجات والجلود بأنزيمات لتحسين مظهرها النهائي. كما تستخدم مساحيق الغسيل الحيوية في البيوت أنزيمات في عمليات الغسيل بدرجات حرارة منخفضة (البروتييز وأحياناً اللايبيز كذلك) للحصول على نتائج أفضل من المساحيق العادية، كما تستخدم صناعية عجينية الورق التقنيات الحيوية كبديل أنظف (وبالتالي أرخص) من استخدام العمليات الكيمياوية والميكانيكية. أما الصناعات البلاستيكية فهي تستخدم البوليمرات المصنوعة بواسطة الكائنات المجهرية، على الرغم من أن هذه المواد مثل Polyhydroxyalkanoates (ومنها خليط Polyhydroxybutyrate mixture – Biopol) - انظر الفصل السادس عشر- قد حققت استعمالاً هامشياً فقط في الصناعة.

أما المواد الحيوية الأخرى مثل أصماغ الزانثان (Xanthan gums) – انظر الفصل السادس عشر – فتستخدم في بعض التطبيقات الصناعية المتخصصة. إلا أن مثل هذا الاستعمال يكون نادراً ولا يستغل معرفتنا بالأنظمة الحيوية وإنما معلوماتنا الطارئة فقط حول خصائصها وخصائص المنتوج. يعود السبب في ذلك إلى استناد الصناعة الكيمياوية في معظم تقنياتها على استخدام الزيوت والغازات النفطية، أو على منتوجات مشتقة من هذه المصادر، وبالتالي فهي رخيصة جداً، وإن الصناعة التي تعمل على تحويل هذه المواد إلى أنواع عديدة مختلفة من المنتوجات هي صناعة مرنة وكفوءة ومتطورة.

3.13 شركات التقانة الحيوية، العناية بها ورعايتها

Biotechnology companies, their care and nurturing

شركة التقانة الحيوية هي شركة أقيمت خصيصاً لتحويل علم التقانة الحيوية إلى منتوج تجاري وبيع هذا المنتوج. إن ما يعرف بالشركة هي قاعدتها العلمية. سوف نناقش في الجزء اللاحق ما هو مطلوب لتحويل شركة التقانة الحيوية من فكرة علمية أولية إلى مشروع تجاري مزدهر.

1.3.13 قواعد عامة — General rules

يجب على شركات التقانة الحيوية أن تربط بين الإبداع العلمي وحاجة السوق، إلى جانب العمليات الرسمية لتصنيع أي تقنية.

الإبداع العلمي — Scientific creativity

ينحصر العلم، في شركة جديدة من شركات التقانة الحيوية عموماً في مرحلة الاكتشاف – اكتشفت شيئاً رائعاً أو اكتشفت تقنية جديدة – عندها يمكنك عمل شيء رائع. وفي كلتا الحالتين تحتاج إلى علم من الدرجة الأولى لكي تؤسس شركة من الدرجة الأولى. وليس من الضروري أن يكون العلم الجيد علماً رائداً فإن للبحث العلمي "صرعات" (Fashions) وصناعة التقانة الحيوية، إلى حدٍّ ما، تتبع هذه الصرعات، لأن هذا المجال من البحث والتقنية استقـطب أكثر الباحثين

تمرساً، وفيه يمكن الحصول على التمويل المالي المناسب. وعلى الرغم من أن العلوم وطرائق العمل الجديدة مثيرة في طبيعها، إلا أنها ليست بالضرورة الوسائل الوحيدة لتطوير مسار البحث المَعني – ولا بد من استخدام طرائق العمل القديمة كذلك، فإن طرائق الاكتشاف المُجربة والمختبرة لازال بإمكانها إعطاء نتائج جيدة.

ولسوء الحظ أيضاً، أنه لم يعد البحث عالي النوعية فقط يفتن الباحث فيأخذ به، وانما يجب أن يتوافق مع ما يراه ويميزه معظم الناس على أنه ممارسة علمية مفيدة. وهذا يعني أن تجاربك سوف تختبر فرضيتك بشكل فاعل ودقيق مع استخدام كافة النتائج والمعرفة المتوفرة لوضع الناتج في السياق التجاري الصحيح. ولعل الاختبار اللاذع لنوعية بحثك غالباً ما يكون رأي المحكمين (Peer review) قبل نشر بحثك في المجلة العلمية.

حاجة السوق Market need

لا يكون العلم وحده كافياً. فعلينا أن نبيع نتاجه إلى شخص ما، إلى السوق. ولكن ما هي حاجة السوق؟ إن مقولة عامة، مثل يحتاج الناس إلى علاج شافٍ للأيدز (AIDS) لا تكون كافية. فمن هم هؤلاء الناس؟ ومن سيدفع؟ وكيف؟ وكم؟ وهل أن منتوجك سيشفي جميع حالات الأيدز أو بعضها فقط؟ وكما أن الإبداع العلمي لا يأتي من فراغ، كذلك فإن بحث السوق (Market research) يجب أن يحقق شيئاً محدداً. إن البحث والتطوير في مجال التقانة الحيوية عملية مكلفة، لذا فمن الضروري وجود اسواق كبيرة للمادة التي تخطط لإنتاجها بحيث يعطي عائداً لكل الاستثمارات المطلوبة.

التصنيع Industrialisation

إذا كان تعريف النجاح في مجال التقانة الحيوية هو تحقيق عائدات تجارية، فعلى الشركة أن تمتلك منتوجاً مطلوباً للشراء من قبل الناس. وكما في حالة أغلبية البضائع التي نشتريها يومياً يتطلب وجود ضمانة نوعية للمنتوج. على سبيل المثال، أنك تفترض أنه إذا اشتريت سيارة جديدة، فإنها ستعمل بصورة صحيحة، وأنك واثق

أن المصنعين قد اختبروا وحوروا هذه السيارة أثناء عملية تطويرها لكي تؤدي وظيفتها بالشكل الصحيح والآمن. يمثل تطوير الدواء المرحلة بين الاكتشاف والتسويق التجاري وهي المرحلة التي تغطي هذه الفحوص وإيجاد الظروف المثلى لها وربطها بصناعة المنتوج وبنوعية عالية. يخضع هذا المجال إلى ضوابط تنظيمية عالية موضوعة من قبل عدة جهات، مثل وكالة الغذاء والدواء (FDA)] [Food & Drug Agency]، ووكالة التقييم الطبي الأوروبية [European Medical Evaluation Agency (EMEA)]. ويجب أن يحصل المنتوج على شهادة الجودة [Certificate of Excellence (CE)] التي تشير إلى جودته. يتوقع من العلماء أن يطبقوا مقاييس الممارسة المختبرية الجيدة [Good Laboratory Practice (GLP)] حتى على مستوى الإنتاج المختبري، مما يعني أن عملهم يخضع لسيطرة عالية، وأن تسجيل النتائج يجري بشكل دقيق، وأن دفاترهم المختبرية تخضع للتفتيش دورياً، وقد يكون أسبوعياً أحياناً.

وعلى منتوجات الأدوية أن تبرهن أنها غير سامة وفعالة وآمنة لاستعمالها من قبل الناس. وقد تستغرق عملية تطوير الدواء وقتاً طويلاً ومالاً كثيراً، لذلك تجد الشركات في هذه المرحلة تحديات كبرى تدفعها إلى إنهاء مهمتها وإنجاز المنتج.

2.3.13 المكونات الأساسية Basic components

إن السوق هو البيئة التجارية التي تعمل فيها الشركة، ولكنه ليس واحداً من مكونات الشركة. وإن العلم هو مكون رئيسي ومركزي، ولكنه ليس العامل الوحيد. وعلى العاملين في التقانة الحيوية أن يدركوا أنه لا يتوجب على العالِم أن يزودهم بكل المتطلبات الأخرى التي تصنع شركة تقانة حيوية ناجحة. فإذا كان الفريق الذي بدأ بالبرنامج التقني الحيوي لا يستطيع رؤية أو توفير المسار نحو الوصول بتقنيته إلى المستوى التجاري، عليه حينئذٍ أن يتحد مع أناس آخرين يمكنهم فعل ذلك. وعلى الرغم من إمكانية الوصول إلى ذلك الهدف من خلال المشاركة مع شركة أخرى، إلا أن مثل هذا الدور عادة ما توفره شركات تأسيسية مغامرة (Seed venture companies)، كما يمكن الوصول إلى ذلك من خلال ما يسمى

بملائكة التجارة (Business angels)، وهم أفراد يأتون بأموالهم وخبرتهم التجارية إلى الشركة على شكل مستثمرين أو مديرين.

3.3.13 الناس People

إن حاجة الشركة الجديدة إلى أفراد ممتازين ومندفعين ذوي التزام ومهارة ومعرفة هي حاجة ملحّة. ولكن من هو الشخص الذي يمكن أن يصنع من هذه الشركة شيئاً ممكناً؟ قد يكون العلماء المؤسسون، ولكن هل سيكون لهم الوقت الكافي لعمل ذلك إضافة إلى عملهم الأكاديمي؟. كذلك، لا يمكن أن تكون هيئة المديرين. فالمهمة تحتاج إلى شخص يمكنه القفز وبكلتا رجليه في مجال العلم والتجارة ويعمل على إنجاح هذا الشيء. إن ثقافة الخوف من الفشل في أوروبا قد حدت من استعداد الأكاديميين للقيام بمثل هذه القفزة، على الرغم من أن اندماج الفرق التجارية في العديد من الجامعات البريطانية قد وفّر طريقاً سهلاً وداعماً لإنجاز مثل هذا الشيء. أما الولايات المتحدة الأمريكية فإنها تدعم، وبحدود معينة، العمل الإنتاجي (Entrepreneurship) حتى على حساب الفشل. ففي هذه الحالة ينظر إلى الموضوع بتقدير حيث إنك حاولت وفشلت، وإن ذلك يثبت وجود الحافز والاندفاع، ومن غير المحتمل للعالِم الذي حاول وفشل أن يفشل مرة أخرى بنفس الطريقة.

إن ثقافة التحجر (Cultural conservatism) في أوروبا تعتبر أن الفشل أهم من المحاولة. وعليه يكون الناس غير راغبين بالمحاولة في الحصول على نجاح كبير إذا كانت هناك احتمالية كبيرة للفشل. ويبدو أن هذا الحاجز الثقافي آخذ بالاختفاء ببطء، فإن الصورة الحسنة للعُلماء الناجحين كمديري أعمال، التي تبرزها الأوساط الإعلامية تشجع على تغيير هذه الثقافة، وإن عدداً متزايداً من العلماء يحاولون الآن. ولكن، حسب تجربتنا الشخصية، فإن العديد من الباحثين الذين يريدون أن يروا تحول علمهم إلى تجارة رابحة غير مستعدين للقفز بقلوب قوية في هذا المجال.

على الرغم من أن الجهة المقاولة المركزية والمنظمة للعمل غالباً ما تكون العالِم المؤسس وصاحب الفكرة الجيدة نفسه، إلا أن هذا لا يعني أنه الشخص

المناسب. فقد تحولت شركة .Packard Inc إلى شركة رائدة في مجال أجهزة التحليل العلمية بواسطة اثنين من خريجي مدرسة للتجارة والأعمال اللذين لم يكونا يعرفان في العلم، في البداية، أي شي تقريباً. على خلفية الفشل والنجاح في أوروبا والولايات المتحدة خلال العشر سنين الأخيرة، فقد أظهرت الخبرة بأن كلتا المهارتين التجارية والعلمية أساسيتان لنجاح الشركة، وأن قليلاً جداً من العلماء من يجمع بين هاتين المهارتين. ومع تطور ونضج قطاع التقانة الحيوية، يوجد الآن عدد كبير من الأفراد الذين عملوا في أماكن مختلفة وبمجالات مختلفة. أفراد تعلموا من أخطائهم وصنعوا نجاحات كبيرة وهم متلهفون لعمل المزيد. إن ما يدعى بالمقاولين المتعاقبين (Serial entrepreneurs) هو هجين نادر يجمع ما بين العلم والمهارة التجارية الممتزجة برغبة عارمة في البحث عن نجاحات أكثر.

4.3.13 المواقف والثقافة Attitude & culture

إن عملية القفز بالقدمين أولاً هذه تتطلب من الأكاديميين تغييراً في نهجهم الثقافي. فإن العلوم الأكاديمية تركز على الموضوع، في حين يركز العلم التجاري على الهدف! وعادة ما يبحث الأكاديميون في موضع أو مجال علمي معيّن ويتبعونه أينما ذهب. ويعرض ناتج هذه المغامرة الفكرية في منشورات علمية الهدف منها هو العملية وتطور البحث والمعرفة العلمية ليس إلا. أما العلم التجاري فهو يعالج أهدافاً محددة وفي ذهنه السوق والمستهلك، بعدها يستخدم أدوات أو مجالات علمية مناسبة لأجل الحصول على المنتوج.

إن لهذه الفروقات الصغيرة تأثيراً ثقافياً كبيراً. فعلى سبيل المثال، يحصل الأكاديمي على مكافأة صغيرة عندما يكون جزءاً من فريق متعدد الاختصاصات، على الرغم من أن دوره يكون أساسياً لمعظم البرامج التجارية. ومن المستحيل أن يصبح العالم الأكاديمي فائضاً، وذلك لأنه وحسب التعريف، أن ما يقوم به العلماء من عمل هو ما ينبغي أن يقوموا به (فقد يكونون غير كفوئين أو لا يستطيعون الحصول على دعم مالي، ولكن هذا أمر مختلف). أما العلماء الصناعيون فيمكن أن يصبحوا فائضين بالتأكيد، بمعنى أن عملهم، مهما كان ممتازاً، لم يعد له حاجة إلى

الوصول إلى أهداف الشركة. ويصبح هذا الموضوع جدياً أكثر عندما تحتاج الشركة إلى التركيز على عدد صغير من المنتوجات أو المشاريع. وهذا بالنسبة إلى العمل الأكاديمي يجعل الأمر يستحق العناء أن يكون لفريق من الأكاديمين عدد من المشاريع بعدد طلبة الدكتوراه الذين يشرفون على دراستهم.

وهذا ليس كمثل الاختيار بين السماء الزرقاء والبحث التطبيقي. فإن العديد من الشركات يجري بحوثاً نظرية، في حين أن معظم العمل الأكاديمي في مجال الطب الحيوي (Biomedicine) هو بالفعل عمل تطبيقي.

يعتقد بعض الأكاديميين أن هذه الفروقات تجعل العلم، في المفهوم التجاري، أقل جاذبية للعالم الذي يبحث عن مستقبلة العلمي. إن هذا الرأي خاطئ لأن البيئة الصناعية/ التجارية يمكن أن تكون مكاناً ممتازاً لإجراء البحث العلمي، ولعدة أسباب:

- إن هذه البيئة تحفز على التفكير، وإن العديد من أفضل العقول في العالم تعمل بالصناعة.
- إن الضغوط التجارية والتحديات المتعددة تعني أن هذه البيئة تتسم بالسرعة والإثارة.
- يمكن تجهيز أفضل الأجهزة والمواد بسهولة ووفرة.
- هناك فرصة حقيقية لتطوير مستقبل العالم في أيٍّ من أو جميع مجالات العلم والتقنية أو التجارة التي تشملها أعمال الشركة.
- هناك فرصة للحصول على مردودات اقتصادية مهمة بنفس الزمن الذي يتم فيه الاستمرار في متابعة العلم المرغوب.

5.3.13 الاستراتيجية Strategy

بعد أن تجد الأشخاص المناسبين والعلماء الممتازين عليك أن تقرر ماذا ستفعل. هذه هي استراتيجيتك: ماذا تريد أن تعمل في المدى المتوسط والبعيد، عدا ممارسة البحث العلمي اليومي. إن استراتيجية شركة ما هي، طبعاً، خاصة بتلك

الشركة، ولكننا نستطيع أن نؤطر الأشياء التي يجب أن تشملها الاستراتيجية وعلى شكل أسئلة. وفيما يلي بعض الأسئلة الاستراتيجية الرئيسية للشركات الصغيرة عندما تبدأ:

- ما هو الهدف الخاص لشركتك؟
- ماذا سيكون منتوجك الأول؟ وهذا شيء أساسي وبشكل مطلق. من بين الأنواع العديدة التي يمكن لعلمك أن يخلقها، عليك اختيار شيء واحد لتبدأ، وأن تركز معظم طاقتك فيه. إن هذا التركيز مهم جداً للشركات الجديدة المعتمدة على العلم، التي تكون مواردها محدودة. وهذا يعني اختيارات صعبة، وقد يعني التخلي عن بعض المشاريع المحببة.
- كيف تتعامل مع النجاح؟ النجاح في البرنامج البحثي يعني عادة البدء ببرنامج التطوير الذي قد يقود إلى التجارب السريرية. هل تملك المهارات والتمويل المالي لإجراء ذلك؟ إذا كان الجواب كلا، كيف يمكنك الحصول عليها؟
- ماذا ستعمل في الخطوة اللاحقة؟ بعد انتهاء البرنامج البحثي الأول (بالنجاح أو الفشل)، هل ستقوم بإنهاء عقود جميع العلماء، أو هل لديك برنامج آخر يمكّنهم من الاستمرار بالعمل؟ تذكر أن العالم التجاري يركز على منتوج معين، ليس على مجال علمي أو عملية. ويجب أن يتلاءم عمل هؤلاء العلماء مع الأهداف العامة للشركة، ومع الفائدة المميزة التنافسية (Competitive advantage) للشركة (لاحظ أدناه). عليك أن تحدد الفائدة المميزة العلمية للشركة، وأين يمكن توظيف هذه الفائدة المميزة، وبالتالي ما هي الأعمال التي سيقوم بها العلماء.

6.3.13 المنتوج مقابل الخدمة مقابل التقنية

Product versus service versus technology

لعل أحد أهم النواحي في استراتيجيتك هي كيف ستقوم شركتك بتكوين وتطوير نفسها لكي تكون ناجحة ومربحة. كان حلم كل شركة تقنية حيوية، أثناء عقد الثمانينيات أن تصبح شركة صيدلانية متكاملة تماماً، مثل شركة Pfizer أو

شركة Roche، بحيث يمكنها تأدية أدوار عديدة تمتد من الاكتشافات الأساسية إلى تسويق المنتوجات إلى الأطباء. ولتحقيق هذا الهدف بواسطة شركة تقانة حيوية صغيرة هو في الحقيقة شيء غير عملي لأنه يحتاج إلى سنين عديدة وتكاليف بالبلايين لبناء مثل هذه البنية التحتية، ولأن المطبات الموجودة على الطريق عديدة.

طوّرت شركات التقانة الحيوية، وبمرور الزمن، استراتيجياتها للدخول في شراكة مع شركات صيدلانية أكبر من حيث تزويدها بمنتوجات جديدة كمجهز لتقنيات وخدمات حليفة. هذا وتختلف الشركات من حيث النوع وما يمكن أن تقدمه، ويمكن إدراج الأنواع التالية منها:

- شركة إنتاج (Product Company). يكون هدفها اكتشاف أو اختراع منتوجات، والوصول بها من خلال عملية التطوير إلى الحد الذي يسمح به تمويلك المالي، ومن ثم بيعها أو إعطاء إجازتها لأحد ما له الخبرة في المراحل الأخيرة من التطوير، وفي التجارب السريرية، والتصنيع، والتوزيع. يشمل ذلك جميع شركات الموجة الأولى الكبيرة للتقانة الحيوية مثل Amgen و Celltech و Chiroscience .

- شركة أدوات (Tool Company). تقوم بتطوير أدوات أو تقنيات تساعد الآخرين في تطوير المنتوجات. والأمثلة على منتوجات هذه الشركات تشمل: برمجيات المعلومات الحيوية، وتقنية غربلة المركبات، ومكتبات الكيمياء التوافقية (Combinatorial Chemistry libraries). ويطلق على هذه الشركات عادة اسم شركات منصات التقنية (Technology Platform Companies).

- شركة أجر مقابل خدمة (Fee for Service Company) لديك تقنية معينة و/أو تقنيين مهرة متوفرين للإيجار أو الاستخدام على أساس عقد بحثي. قد يشمل هذا التركيب الكيميائي، غربلة الأدوية، وفحوصات حيوية، ونواحي أخرى عديدة في مجال العمل ما قبل السريري وفي أثنائه.

- شركة هجينة (Hybrid Company). لديك مدىً من الوسائل أعلاه مما يوفر لك مزيجاً يمكن أن يؤدي إلى نشاطات تحقق أموالاً بفترة قصيرة يمكن توظيفها في مشاريع بحوث وتطوير طويلة الأمد. والأمثلة على ذلك تشمل الشركات التي تبيع الأدوات والخدمات التشخيصية، وهي تعمل في نفس الزمن على بحوث الأدوية العلاجية.

عليك أن تعرف كذلك أن استراتيجيتك قد تتغير في المستقبل. إن أكثر الشركات نجاحاً طورت استراتيجياتها وشكل أعمالها بشكل كبير مع مرور الزمن لأجل الوصول إلى أفضل النجاحات، ولاختزال تأثيرات الفشل، ولاستيعاب البيئة الخارجية المتغيرة دوماً. كذلك يكون من المفيد جداً أخذ فكرة جيدة عن الوسائل التي تسلكها الشركات المختلفة واستغلال هذه المعلومات لتحديد الطريق الذي يمكن لعملك أن يسلكه ويقوده إلى النجاح.

7.3.13 النجاح Success

يجب أن تكون الاستراتيجية قادرة على تعريف النجاح بطريقة مفيدة ومفهومة. اسأل نفسك ما هو هدفك النهائي؟ ومن ثم فكِّر، واستنتج إذا كان هذا الهدف ذكياً، بمعنى أنه: خاص، قابل للقياس، ممكن تحقيقه، واقعي ويمكن تحديده بزمن معين. وما هي الخطوات المهمة لتحقيق لذلك، وكيف ستوضح بأنك قد تجاوزت هذه الخطوات؟

يعرف النجاح في الاقتصاد الرأسمالي بالمفهوم التجاري. وبمعيار آخر، فإن صناعة التقنية الحيوية ككل، كانت إما ناجحة جداً أو فاشلة تماماً، وإن عدداً قليلاً فقط من شركات التقنية الحيوية أصبحت رابحة على أساس بيع منتوجاتها – ويبدو أن بقية الشركات يمكن اعتبارها فاشلة تجارياً، علماً أن 90% منها لا زالت موجودة كشركات علمية نشطة، وأن أكثر من 60% منها قد أعطت مستثمريها الأولين معدلَ عائدٍ داخلي (IRR (Internal Rate of Return (وهو مقياس للنجاح المالي للاستثمار – لاحظ أدناه) يبلغ أكثر من 10%، وهو عموماً يعتبر نجاحاً استثمارياً. أما بالنسبة إلى الشركة التي بدأتها فيمكنك معرفة درجة نجاحها

وتقدمها بصورةٍ أسهل من خلال وصولها إلى مراحل مهمة مثل توقيع عقد تعاون كبير مع شركة صيدلانية، أو من خلال دخول منتوجك الأول مرحلة التجارب السريرية، أو الوصول إلى إثبات مفهوم ما في عملية التطوير التي تقوم بها.

8.3.13 الميزات التنافسية Competitive advantage

هذه عبارة جديدة مأخوذة من دليل الإدارة لعقد الثمانينيات، وتعني أن باستطاعتك عمل شيء أحسن من منافسيك، أو يمكنك عمل شيء لا يستطيعه أحد غيرك (أو، وبواقعية أكثر، يستطيع عمله عدد قليل جداً من الآخرين). فعندما تسأل، كمقاول أو كشركة ناشئة، "ما هذا"، بدلاً من أن تكون جيداً به فقط، عليك أن تكون بارعاً وممتازاً، وكيف تستغل هذا لمصلحتك التجارية؟ البراعة هي الشعار هنا، ويمكن تصنيفها في خمسة مجالات؟

أن تمتلك براءة الاختراع لإجراء العملية. وهذا شيء مهم جداً. على العلماء أن يحصلوا دائماً على براءة اختراع على الأفكار أو العمليات أو الاختراعات التي يعتقدون بأنها ستكون مفيدة لهم أو لأناس آخرين. براءة الاختراع تمنع أي شخص من العمل في مجال اختراعك بدون موافقتك. إنها بالتأكيد لا تمنع أي شخص من تقليد اختراعك، ولكنها تجعل من ذلك عملاً غير قانوني، وعندها يمكنك أن تقاضيهم إذا كان لديك المال والوقت لذلك. براءات الاختراع مهمة جداً في عالم التقنية الحيوية التجاري. فالمضاربون الرأسماليون يكونون قلقين جداً حول الاستثمار في شركة ذات براءات اختراع ضعيفة أو ليس لها براءة اختراع، وذلك لأنه حالما يصبح اختراعك معروفاً وعلنياً فإن العديد من الناس سيعملون على تقليده ويحاولون سرقة فكرتك والعائدات المالية المحتملة. مثال على براءات الاختراع هو براءة الاختراع على تفاعل السلسلة للبوليميريز [Polymerase Chain Reaction (PCR)] الذي تملكه شركة Hoffman – La Roche وبهذا فإن أي شخص في العالم يستخدم الـــ (PCR) لأغراض تجارية يجب أن يدفع أموالاً للحصول على إجازة وإلا فإن الشركة ستقاضيهم.

لديك الأدوات الضرورية لإجرائها. إن لهذا نفس أهمية براءة الاختراع في المدى القصير، ويعني أنه في حين يمكن نظرياً لشخص ما أن يقلد اختراعك إلا أنه لا

يمكنه تحقيق ذلك لعدم توفر الأدوات. أمثلة على ذلك هي امتلاكك لخط خلايا رئيسي معين، أو مستنسخات جينية، أو أجهزة إنتاج لا يمتلكها غيرك. إن هذا يعتبر فائدة تنافسية لحين تمكن منافسيك إما من تقليد أو إيجاد طرق بديلة تجعلهم لا يحتاجونها: حدوث مثل هذا الشيء يكون ممكناً مع الزمن وتوفر الأموال والجهد اللازم.

لديك المهارات الضرورية للقيام بها. وهذه تعتبر سلاحاً تنافسياً قوياً لحين تعلّم شخصاً آخر كيف يجريها. ويسمى هذا النوع من المهارات أحياناً برأسمال الشركة الفكري. ولقد كان الممارسون الأوائل في علم التخصيب خارج الخلايا *(In vitro* fertilization) بمثل هذا الموقع إلى حين تَعَلّم المنافسون الآخرون هذا الفن ولحقوا بالأوائل.

لديك الكثير من الموارد أو المال لإجرائها. يمثل هذا أضعف نوع من الميزات التنافسية في التقانة الحيوية، وذلك لأن هذه الصناعة هي غالباً مرتكزة على المعرفة وليس على الموارد. والعديد من الشركات تمتلك موارد عديدة، وخاصة الشركات الرئيسية في المجال الصيدلاني أو الزراعي، وإذا كانت الفائدة التنافسية الوحيدة التي تمتلكها هي شراؤك 20 جهازاً لتوليف الحمض النووي DNA والعديد من الكومبيوترات والتقنيين لتشغيلها، فإنك ستخسر هذه الميزة التنافسية بعد فترة قصيرة إلى شركة أخرى يمكنها شراء 30 جهازاً لتوليف الحمض النووي. طبعاً إذا كنت لا تعرف استخدام هذه الموارد بشكل فعّال، فإن فوائد توسيع العملية ستختفي.

تكون أنت أول من يجريها. وهذه هي الأقل جاذبية بين الأخريات، ولكن عادة ما تبدأ بها شركات التقانة الحيوية. يرون فرصة ثم يبدأون بتأسيس شركة لاستغلال هذه الفرصة. الفائدة هنا هي قدرتهم على الحركة أسرع من أي شخص آخر، وهذه الحالة تدوم فقط إذا كنت مستمراً بالحركة، ولكن أن تكون الأول هو شيء صعب دائماً. الأشكال الأخرى للميزات التنافسية تشمل امتلاكك لمصانع كفوءة يمكنها أن تنافس على السعر وسهولة التجهيز، أو تطوير اسم علامة تجارية (Brand) معروفة. ولكن هذه الفائدة تكون فعالة جداً فقط عند اطلاق المنتوجات إلى الأسواق وحين تستلم المهمة فرق التصنيع والتسويق.

الطريقة الوحيدة لإظهار امتلاكك ميزة تنافسية ومقارنة نفسك بالمنافسين الآخرين هي تبيان أن ما تريد عمله ممكن التحقيق فعلاً. يعني هذا، في الاكتشافات العلاجية، إثباتك أن منتوجك له بعض التأثير في الناس (تذكر أن معظم برامج اكتشاف الأدوية تبوء بالفشل). وبما أن عملية تطوير منتوج إلى الدرجة التي يوفر فيها فعالية علاجية، هي عملية تتطلب مئات الملايين من الباوندات، فإن الشركات غالباً ما تقبل بإثباتات أقل صرامة، مثل سبب إثبات علمي قوي يفترض أن الدواء سيعمل، أو دليل على فعاليته خارج الخلايا *(In vitro)*، أو دليل على فعاليته في الحيوانات، أو دليل على أنه لا يسبب ضرراً للإنسان (نتائج المرحلة الأولى). كل خطوة على المسار في الشكلين (1.13) و (2.13) ستضيف إلى الدليل وتدعم موقفك التنافسي.

9.3.13 الذكاء التنافسي Competitive intelligence

إن معرفة درجة كفاءتك الآن مقارنة بدرجة الكفاءة التي يجب أن تكون عليها هي جزء من الإثبات على امتلاكك لقدرة تنافسية. وهذا هو ما يسمى بالذكاء التنافسي. هل هناك حاجة طبية معينة ستعمل على سدّها، وهل هناك آخرون قد سدّوا هذه الحاجة أصلاً؟ هل أن هذه الحاجة ستبقى إلى عشر سنوات أخرى؟ من هم الآخرون الذين يعملون على سدّ هذه الحاجة، وهل هم متقدمون عليك؟ هذه مجموعة من الاستكشافات حول ما تعمله المنافسة، وما هو السوق؟ هناك عدد مذهل من مقترحات الأعمال التي شاهدناها، والتي لا تحتوي على دليل بمعرفة أصحابها بوجود عالم خارجي، ومعرفة أقل بأن هذا العالم الخارجي قد يحوي منافسين.

10.3.13 خطة العمل The business plan

كثير من الذي ذكر أعلاه يتعدى الاستراتيجية ويندرج في التكتيكات. يجب أن يجري التخطيط التكتيكي بواسطة فريق متخصص يجمع المهارات العلمية ومهارات تطوير الناتج والمهارات المالية والتجارية معاً، لأن جميع هذه الأشياء أساسية. إن المنتوج النهائي لعملية التخطيط هذه هو خارطة طريق مفصلة لما

سيكون عليه عملك، وهي ليست نهاية بحد ذاتها. وبغضّ النظر عن مدى جاذبية هذه الخريطة وإبداعها فإنها تكون عديمة الفائدة إذا لم يكن التخطيط لها دقيقاً جداً، وإذا لم تتبع بالشكل الصحيح.

خلال استحداث خطة لإنشاء شركة تقانة حيوية، على العلماء أن يضعوا في حسبانهم أن أصحاب البنوك والمحاسبين وغيرهم يحددون لهم أي تجارب يستطيعون أولاً إجراءها في الشركة. ليس ذلك فقط، ولكن هؤلاء الناس لهم بالحقيقة وجهات نظر سليمة ومفيدة يمكن أن تحسن وتركز خطة الشركة بشكل كبير. ونموذجياً، إن المراحل التي تمر بها هذه العملية ملخصة أدناه. علماً بأننا قد تطرقنا إلى العديد منها سابقاً.

- حدِّد نوع العلم الذي سيدخل شركتك وحسب المعايير التي لخصناها أعلاه.
- حدِّد ماذا ستعمل مع هذا العلم. هذا هو الجزء الأول من خطة العمل، كتابة وثيقة تصف بدقة خطة العمل وكيف تعمل. ويجب أن تأخذ بعين الاعتبار التالي:
  - ماذا يمكن للعلم أن يعمل حقاً؟
  - من الذي سيقوم به، وأين؟
  - من الذي سيقوم بالإدارة (أي التأكد من حدوث كل شيء)؟
  - هل هناك أجزاء لا تستطيع الشركة القيام بها، أو لا يكون من الصواب القيام بها، وإذا كان كذلك، من هو الذي سيقوم بإجرائها، وكيف ستدفع لهم؟
  - من هو الذي سيمتلك الملكية الفكرية الجديدة (New intellectual property)، ومن هو الذي سيدير برامج التطوير؟
  - ما هي الإنجازات الرئيسية التي يجب التوصل لها؟
- حدِّد الفائدة التنافسية للشركة.

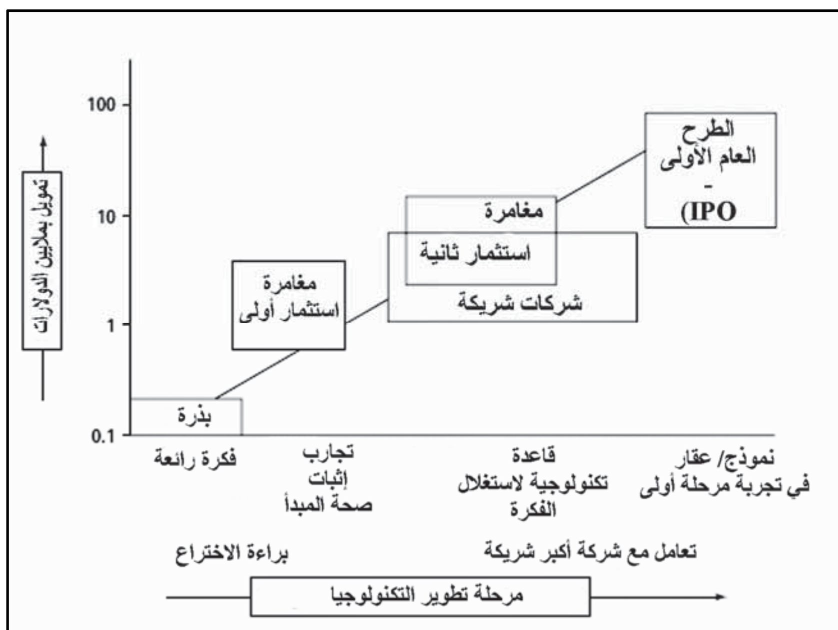
- كيف سيتم تمويل الشركة، وبالخصوص، كم من المال تحتاج لكي تبدأ؟
- أين ستكون عند نفاد التمويل، وعندها من هو الذي سيعطيك المزيد من المال؟
- إلى من ستبيع منتوجك، وهذا يعني ما هو منتوجك؟
- ماذا سيحدث في حالة الفشل؟

قد يكون قبول النقطة الأخيرة صعباً لبعض العلماء، ولكنها حقيقة إحصائية حيث إن معظم البرامج العلمية المتوجهة نحو التجارة تفشل، وعليك أن تسأل ماذا سيحدث لشركتك آنذاك؟ إذا كانت الشركة ذات منتوج واحد، فعند فشل المنتوج ستفشل الشركة، وسيكون الجميع عاطلين عن العمل. لذا يكون من الحكمة البحث عن تقنيات أخرى يمكنك جلبها إلى شركتك. من الممكن، وبعد مرور سنة، أن يتم التخلّي عن نصف العلم الممتاز الذي قاد لتأسيس الشركة! ويجب النظر إلى ذلك كدليل على النمو والتطور، وليس فشلاً، على شرط استبداله بشيء أحسن.

إن هدف العملية بأكملها هو تشخيص أقصر طريق بين أين أنت الآن، وأين تريد أن تذهب (لكن لا تأخذ طرقاً مختصرة غير مبررة علمياً) مع وجود خيارات مناسبة، إذا لم تسر الأمور حسب الخطة. لهذا السبب تكون الاستراتيجية مهمة – لا يمكنك تشخيص الطريق الأقصر إلى المكان الذي تريد الوصول له ما لم تعرف أين ذلك المكان. كما توضح كذلك عدم إمكانية الفصل بين القضايا العلمية والتجارية في الشركة.

سيكون ناتج هذه العملية عبارة عن خطة مفصّلة لما ستعمله الشركة، ولماذا ستبقى، ومن الأفضل أن تزدهر إذا أعطيت كمية من المال. إضافة إلى ذلك ستكون وثيقة عمل للتخطيط والتوجيه للشركة، كما ستكون خطة العمل الأساس الذي يستند إليه اقتراح الاستثمار. لأجل الحصول على المال المطلوب لتنفيذ جميع هذه الخطط عليك بأخذ الخطة إلى ممول وتقول له، أنا اقترح عليك الاستثمار في هذه الشركة، لأنها ستفعل بهذه النقود كذا وكذا، وبإمكاننا الحصول على أموال أكثر نتيجة لذلك؟

من المستحيل لأي خطة عمل أن تكون صحيحة 100%، وبالحقيقة، فإن عدة عناصر فيها ستكون خاطئة بالتأكيد. من أحداث غير مرئية، وإنجازات أو إخفاقات علمية إلى انهيار سوق الأسهم، كل هذه الاحتمالات ستضع المخاطر في طريق خطتك الموضوعة بعناية. وسيكون هناك تحديات غير متوقعة على الطريق يجب التهيؤ لها، وحتى قبولها، ولكن إذا لم تتمكن من التخطيط لطريق النجاح، فمن الأفضل أن لا تحاول أصلاً.



الشكل 3.13: التمويل لشركات التقنية الحيوية الأوروبية الناشئة. المحور السيني (x-axis) يمثل مراحل التطوير التقنية لشركة تقانة حيوية صغيرة جديدة. المحور الصادي (y-axis): مستوى التمويل الذي تتوقعه الشركة بعد تمويل رأس المال المغامر. توضح الصناديق أنواع التحولات التي تحصل عليها الشركات الأوروبية في مراحل مختلفة من تطورها التقني.

4.13 الاستثمارات في التقانة الحيوية

Investment in biotechnology

بعد تحديدك لهدف شركتك فإنك ستحتاج إلى المال لكي تبدأ. قليل جداً من أفكار التقنية الحيوية يمكن تحقيقها بطريقة لا تحتاج إلى الاستثمار. ويكون الاستثمار

أحياناً بالآلاف، قليلة فقط من الجنيهات لأجل صنع أول مادة يمكن بيعها. إلا أن العملية تتطلب عادة عشرات أو مئات الملايين. هناك عدد قليل من الأفراد يمكنهم توفير مثل هذه المبالغ، لذلك، عليك بإقناع أناس آخرين للاستثمار بشخصك وفي فكرتك، وهؤلاء الآخرون هم المستثمرون. هنالك مختلف أنواع المستثمرين، واعتماداً على المرحلة في شركتك، سوف يمولونك على مراحل. يوضح الشكل 3.13 هذه المراحل على الطريق النموذجي لتمويل الشركة. إن معرفة هذا الطريق ودوافع الناس الذين ستلتقي بهم خلاله سيكون شيئاً مهماً، إذا كنت تريد إيجاد التمويل لشركتك.

مثالياً، يجب أن لا يكون المستثمر مصدر تمويل فقط. بعض المستثمرين يساعدونك بوقتهم وخبرتهم في تأسيس وتشغيل العمل، وليس فقط كأعضاء هيئة إدارية، ولكن أيضاً في القضايا التشغيلية اليومية. ويعتبر هذا أحد الموارد المهمة، خاصة في المراحل الأولى، حيث تعاني الفرق الصغيرة فجوات في مهارات معينة التي ستكون لا شك مثقلة بسبب محاولتها إدارة عدة مهام في نفس الزمن. مثل هؤلاء المستثمرين الذين يضعون أياديهم في العمل يمكن أن يوفروا المساعدة في عدة مجالات مثل عقود المستخدمين، والموقع/ والوسائل، وتأمين الملكية الفكرية باستخدام موظفين لنقل التقنية في الجامعات، ومحامي براءة الاختراع، وفي استخدام كادر ماهر إضافي من خلال اتصالاتهم ونشاطاتهم في تطوير العمل.

1.4.13 استثمار التأسيس Seed investment

الخطوة الأولى في تطوير فكرة ما إلى شركة (التي تشمل كل العمليات التي أشرنا لها سابقاً) هو البحث عن تمويل التأسيس (Seed funding). يوفر تمويل التأسيس كمية كافية من المال لإنشاء الشركة والحصول على براءات اختراع رئيسية، والتفاوض من أجل خروج مشرف للعلماء المؤسسين من وظائفهم الحالية وخلق كيان الشركة. يستخدم هذا التمويل كذلك في عملية التخطيط وكتابة خطة العمل، وهي عملية تأخذ وقتاً طويلاً، وتحتاج إلى مهارات عالية وتشمل استخدام المحامين، ووكلاء براءات الاختراع، والمحاسبين. يتم توفير تمويل التأسيس من قبل مستثمرين خاصين (Private) (انظر أدناه) أو من قبل شركات محترفة ومتخصصة في استثمار

التأسيس، التي لا زالت نادرة الوجود في أوروبا، إلا أنها أكثر شيوعاً في الولايات المتحدة الأمريكية. توجد قلّة في استثمار التأسيس الذي يأخذ الشركة الواعدة من مرحلة "عندي هذه الفكرة العظيمة" إلى مرحلة "هذه شركة يمكنك الوثوق بها". يعود السبب في ذلك، جزئياً ، إلى أن المخاطر في هذه المرحلة تكون هائلة والمردودات غير أكيدة. إن مايسمّى بفجوة التمويل (Funding gap) وتعني، عندما تكون الشركة قادرة على جمع رأسمال كافٍ للتأسيس، ولكنها لم تصل بعد إلى هذا الحجم، أو بيان إمكانيات كافية لجذب انتباه المؤسسات المضاربة برأس مال أكبر.

2.4.13 التمويل الخاص بالتقانة الحيوية

Private funding for biotechnology

حالما تتأسس الشركة فإنها ستحتاج إلى أموال طائلة للاستمرار في متابعة أهدافها في تطوير المنتوج. تمول الشركات الناشئة عادة عن طريقة الاستثمار الخاص في الشركة من قبل أفراد أو مجاميع من الأفراد. وتكون مثل هذه الاستثمارات عادة من خلال شراء الأسهم الجديدة. وبهذا سيصبح المستثمرون الجدد من حملة الأسهم، وسيتم تخفيف حملة الأسهم القدامى (أي اختزال أسهمهم في الشركة). قد تبدو فكرة امتلاك أسهم أقل سيئة من وجهة نظر المؤسس، إلا أنه من الأفضل امتلاكك لأسهم أقل، في شركة، قيمةً وحيويةً بدلاً من امتلاكك لجزء كبير في شركة لا تساوي إلا القليل، وفي طريقها للإفلاس. حالماً تتأسس الشركة، فإنها ستعمل على جذب تمويل مالي أكثر لكي تحقق خططها الموضوعة في خطة العمل. يسمى هذا التمويل بتمويل الجولة الأولى (First round finance) (تمويل التأسيس لا يعتبر مالَ استثمارٍ حقيقياً) وهو يأتي من أحد مصدرين.

المستثمرون الخاصون

هؤلاء هم أشخاص أغنياء تكون لهم القدرة على وضع كميات كبيرة من النقود (بحدود 250000 دولار أمريكي في الأقل) في الشركة، ويكونون جزءاً فاعلاً في مساعدة الشركة بالمجالات المالية والتجارية، والأكثر أهمية من ذلك هي مجازفتهم بأموالهم التي قد يخسرونها بهذا الاستثمار.

المضاربون الرأسماليون Venture capitalists

وهؤلاء هم أشخاص أو شركات متخصصون في الاستثمار في المقترحات الخطرة. يُنشئون صندوقاً يضع فيه الناس أموالهم، ومن ثم يقوم مدير الشركة باستثمار رأس المال بمضاربة عالية الخطورة. إن هذا مشابه تماماً لاستثمار صناديق الائتمان، وهي من الطرق الشائعة للتوفير التي يستعملها عامة الناس، ولكنه أكثر خطورة، حيث يأمل المستثمرون بعائدات أعلى. كلا المستثمرين يعملان على تقييم شركتك على أساس معايير معينة تشمل طبيعية الناس العاملين في الشركة، ومدى اجتهادهم في فهم واستيعاب العلم، وعادات الاستثمار، وفيما إذا كانت هناك أي جهات أخرى مستعدة لتمويل الفكرة. وقد تستغرق عملية التقييم هذه بعض الزمن (غالباً أشهر)، ويمكن أن تكون ذات متطلبات عالية على الشركة والمستثمرين كذلك.

الناس People

معظم المجموعات المضاربة برأس المال تستثمر بالأشخاص بقدر استثمارها بالعلم. بالإضافة إلى النواحي التقنية، فإن الشركات المضاربة تبحث عن الفرق التي تملك الأطقم ذات المهارة الصحيحة (عمل وعلم)، التي تعمل بتناغم مع بعضها بعضاً والأدلة على قدرتها في تنفيذ الوعود التي قطعوها للمستثمرين. ومن الأشياء الجيدة في مواصفات المؤسسين العلميين للشركة هو بيان استعدادهم لتعلم خبرات جديدة، وأن يتعاونوا مع أشخاص من مختلف المجالات والقدرة على التفكير والتحليل أثناء التحديات، ودوام تركيزهم على أهداف عمل الشركة. من المواصفات المفيدة الأخرى هي الفطنة التجارية والرغبة في تكوين أموال كثيرة.

سيبحث المضاربون الرأسماليون كذلك عن إدارة خارجية إضافية لدعم الشركة، وبالذات عن مدير تنفيذي (Chief Executive Officer – CEO). مثل هذا الشخص يجب أن تكون له خبرة في إدارة العمليات التجارية التي تعتمد على العلم، ويجب على العلماء قبوله كقائد لشركتهم، وأن يكون شخصاً موثوقاً لكي تقدمه إلى أصحاب البنوك والمحاسبين والآخرين من المحترفين في المدينة. سيكون هذا مهماً جداً أثناء نضوج الشركة وبحثها عن تمويلات إضافية.

الحيطة Due diligence

بعد تأكدهم من أن الأشخاص المستخدمين في الشركة مناسبون، سيجري المضاربون (VC_s) الرأسماليون اختباراً خاصاً للعملية، عن طريق الاستعانة بخبراء، ويتأكدون من صحة براءات الاختراع عن طريق محامين، ويسألون ويتحرون في الاجتماعات والمؤتمرات. كل ذلك ليتأكدوا من قوة وكفاءة العلم والتقنية المستخدمة والأشخاص المستخدمين في الشركة. يعرف هذا الإجراء بالحيطة (مأخوذة من عبارة قانونية معناها: لقد عملت جلَّ ما استطيعه). وقد تختلف عملية الحيطة هذه في طبيعتها عن تبادل أحاديث يجريها أصحاب الشأن في بار للحصول على انطباع "غير رسمي" عن مشروع استشاري ضخم قد يكلف مئات أو الآف الجنيهات.

إن عملية "الحيطة" تزود المضاربين الرأسماليين بتقدير عن متانة العلم الحالي في الشركة، وماذا ستكون حالة السوق، والمخاطر التي يجب معالجتها خلال تقدم العملية. وعادة تختلف آراء عملية الحيطة عن آراء العلماء مادياً. كما أنه من المفيد لمؤسس الشركة أن يتحرى عن الشركة المضاربة، وماذا فعلت للناس في السابق في مجالات المساعدة بالإدارة والنصح في الاستراتيجية العلمية والتجارية، وفي بناء الشركة بحيث تستطيع أن تواصل نجاحاتها والتواصل في عالم المال. وفي النهاية، فإن الحيطة ضرورية في اتخاذ القرار والمخاطرة، فالمستثمر يعمل عادة تحريات كافية للوصول إلى النقطة التي يمكنه فيها أن يقرر فيما إذا كانت خطوة استثمار معينة (بالرغم من المخاطر الموروثة) تستحق أخذها، أو أن جميع المؤشرات تشير إلى أن عدم الاستثمار هو الأفضل.

طريق الخروج Exit route

لا أحد من الذين يستثمرون مالاً في شركة تقنية حيوية ناشئة يتوقع أن يسترجع أمواله من أرباح الشركة، على الأقل، لفترة خمسة سنوات كحد أدنى. لذا يتوجب إيجاد طريق خروج آخر يمكنهم من خلاله استرجاع أموالهم. طريق الخروج هذا يمكن أن يكون:

- بيع أسهمك الخاصة في الشركة إلى شخص آخر.

• شراء الشركة من قبل شركة أخرى (اندماج أو استحواذ هما مصطلحان لنفس العملية).
• التعويم في سوق الأسهم، وتعني بيع أسهمك للناس.

كل الأشياء المذكورة أعلاه تكون ممكنة في حالة كون الشركة ناضجة ببحوثها ومنتوجاتها، وبهذا فإن السؤال هنا هو: متى سيحدث هذا؟ بالنسبة إلى المستثمرين، فإن كلمة متى، مهمة جداً، لغرض حساب عائد الاستثمار (Return On Investment – ROI): 100% زيادة في القيمة في سنة يعني 100% ROI في السنة، و 200% زيادة في أربع سنوات يعني 50% ROI، حتى لو كانت الكمية المطلقة للأخير هي الأعلى.

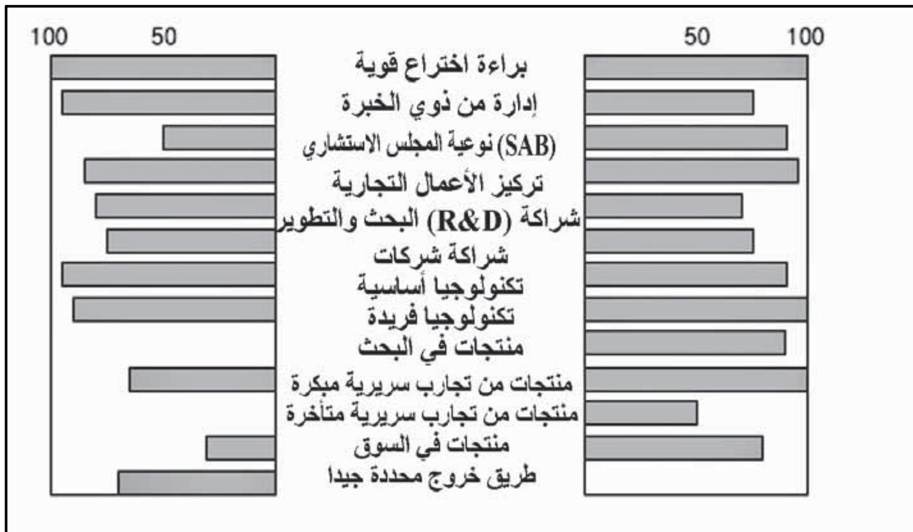
مراحل التمويل Funding stages

تستثمر الشركات المضاربة عندما تكون الشركة قد حصلت أصلاً على بعض تمويلات الاستثمار، وطوّرت خطة العمل، واستخدمت الفريق الرئيسي للعمل. ويعرف هذا التمويل بالجولة الأولى (First –round finance)، أو تمويل المرحلة الأولى، ويكون عادة بين نصف مليون وثلاثة ملايين جنيه. وإذا سارت جميع الأمور بشكل جيد، يتم تعويم الشركة في سوق الأسهم خلال سنتين أو ثلاث سنوات. ويجب أن تدر هذه العملية 10–30 مليون جنيه. مع أن الشركة قد تحتاج إلى تمويل إضافي لكي تصل إلى هذه المرحلة، وهذا ما يطلق عليه تمويل الشرفة الدنيا (Melzznine financing).

3.4.13 الشركاء المتحدون Corporate partners

المصدر الرئيسي الآخر لتمويل شركتك الجديدة هو الشركات الأخرى، وتكون عادة شركات أكبر من شركتك بكثير. إن هؤلاء قد يكونون عملاء (أي، الذي يشترون منتوجك)، إلا أن معظم شركات التقانة الحيوية لا تملك منتوجاً في الأيام الأولى. لذا فإن الشركات الكبيرة قد تصبح شريكة لك لتساعدك في تطوير منتوجك بعملية تعرف بصفقات التطوير المشترك (Co-development deals).

إنهم سيستفيدون في هذه الحالة لأنك تملك شيئاً يمكن أن يساعدهم في عملية الإبداع، كما سيحصلون على مدخل إلى تقنيات جديدة وإلى منتوج بوقت مبكر.



الشكل 4.13: إلى ماذا يتطلعون في شركات التقانة الحيوية. ملخص لمسح قام به Young, و Ernest لجزء من مستثمري مضاربي رأس المال (اليسار) و للشركات المتحدة متعددة الجنسية (اليمين) أوضحا فيه أن نواحي معينة في شركات التقنية الحيوية تكون أساسية في قرار التمويل أو الاتحاد معها على التوالي. يتناسب طول العمود المضلل مع النسبة المئوية للذين يعتبرون هذه الناحية مهمة.

أما أنت فتستفيد لأنهم يوفرون المهارات أو البيئة البحثية التي لا تمتلكها. كما أن الشركاء المتحدين سوف يمولون وينظمون ويجرون التجارب السريرية في مرحلة لاحقة (التي يمكن أن تكون مكلفة بشكل كبير ومعقدة جداً). وجوهرياً، إن الشركاء المتحدين هم عبارة عن اتحاد بين متعاون وعميل. أنت تحصل على التمويل والموارد، وهم يحصلون على برامج أو منتوجات جديدة. وهناك أنواع مختلفة من الترتيبات لتكوين الشركاء المتحدين تتراوح من الشيء البسيط، مثل شراء السلع إلى شراء الشركة. علماً، أن الأشياء التي يبحث عنها الشركاء المتحدون في شركتك هي مشابهة، وبشكل مدهش، لتلك الأشياء التي يبحث عنها المضاربون الرأسماليون، وكما هو موضح بالشكل (4.13) عليك أن تضع في حسبانك أن شركات قليلة تمتلك كل هذه الأشياء، وإذا كانت شركتك الناشئة لا تملك أيّاً منها ستجابه مشاكل في الحصول على

التمويل. (سيأتي استرجاع موضوع التمويل لاحقاً من خلال الزيادة غير المباشرة للضرائب التي تدفع من الشركة، إذا تمّت وازدهرت!).

4.4.13 المنح المادية Grants

في بعض الأحيان، تقوم الوكالات التي تزود الأبحاث الأكاديمية بالدعم بتزويد شركات التقنية الحيوية بالدعم أيضاً. ولكن غالباً ما يكون الدعم الحكومي موجهاً إلى مشاريع صغيرة أو متوسطة الحجم (SMES). إن صناعة التقنية الحيوية ترتكز على المعرفة، وهي نظيفة، وتكبر بسرعة، وترتكز على الاستثمار المزمن للغرب في بنيته التحتية العلمية والتقنية. كذلك، إن أكثرها يهتم في مجال العناية بالصحة، وهو المجال الاقتصادي الوحيد تقريباً الذي ينمو كل عقد في القرن العشرين. لذا فإن التقنية العلمية ينظر إليها على أنها "جيدة" على السواء اجتماعياً واقتصادياً، وهي تحظى بتشجيع ومباركة الحكومات.

كل هذا أدى إلى زيادة الدعم الحكومي لتقنية حيوية جديدة يمكن أن تستفيد منها الشركات الناشئة، وهذا يشمل:

- دعم التطوير المناطقي (Technology Transfer Scheme). وهو دعم حكومي يأتي في محاولة لتشجيع الصناعة للاستقرار في منطقة معيّنة بدلاً من الأخرى. أحياناً قليلة فقط تدعم فيها المناطق التي استقر فيها العلم والعلماء.
- جهود التنسيق الوطنية والدولية (National and International Coordination Efforts. وهي محاولة لجعل السياسة التقنية أو الدعم المناطقي تتكامل جغرافياً. هناك بعض المخططات المعتمدة على التجارة، مثل Eureka لتشجيع تطوير التجارة بين الدول الأوروبية.
- برامج البنى التحتية الرئيسية ذات العلاقة بالتقنية الحيوية. تدعم الحكومات في أوروبا والولايات المتحدة برامج رئيسية للأعمال التي لها توجهات في مجال التقنية الحيوية مثل مشاريع الجينوم.

- برامج انتقال التقنية. وجدت هذه البرامج لتساعد في انتقال العلم أو التقنية من الجامعة (عادة) إلى السوق التجاري، وباتباع النموذج الأمريكي، ويبدو أن مكاتب انتقال التقنية في أوروبا أصبحت الآن أحسن تجهيزاً ومهارة مما يجعلهم أقدر على إيجاد الطريق الأفضل نحو السوق التجاري.
- برامج دعم الشركات الصغيرة Small Company Support Scheme، كمشاريع SMART و SPUR. في المملكة المتحدة. وهذه مشاريع عامة لمساعدة الشركات الصغيرة على الانطلاق بمساعدة حكومية مباشرة. وهناك مشاريع مماثلة في عدة دول أخرى. وتختلف الشروط للحصول على هذه المكافآت من دولة إلى أخرى، ولكن في غالبية الأحيان ليس هناك ضرورة لإعادة هذه الأموال (يمكن لاحقاً زيادة الضرائب على هذه الشركات إذا إزدهرت وكبرت).

يمكن لعدد من المنح الحكومية أن تموّل مجموعة كبيرة من الشركات، وخاصة إذا كانت موجودة في منطقة مستهدفة لغرض التطوير الاقتصادي. والمناطق المشمولة في أوروبا هي ليفربول في المملكة المتحدة، وصقليا في إيطاليا. وعموماً إذا كانت الشركة معتمدة على المنتج لبقائها فإن ذلك يمثل فكرة اقتصادية سيئة منذ البداية.

5.4.13 سوق الأسهم والتقنية الحيوية

The stock market & biotechnology

يمكن للشركات الراسخة (Established) الحصول على الأموال من عامة الناس عن طريق بيع الأسهم في الأسواق حيث يقوم سماسرة يخضعون لضوابط مناسبة ببيع وشراء الأسهم نيابة عن وكلائهم. إن التمويل العام بهذه الطريقة له قيود مختلفة تماماً عن التمويل الخاص، حيث يكون خاضعاً لضوابط دقيقة لمنع الشركات أو السماسرة من الاحتيال على الناس.

لحملة الأسهم (Shareholders) حقوق قانونية ما يعني أنهم هم من يقرر مستقبل الشركة، وأن العديد من كتيبات الشركة تتحدث عن زيادة قيمة حامل السهم

اعترافاً منها أن هؤلاء الناس هم بالحقيقة من يملك الشركة. ومبدئياً، بإمكان حملة الأسهم أن يُقيلوا الهيئة الإدارية (Board of Directors) (انظر أدناه) أو أن يطلبوا محاسبة الشركة على أعمالها، ولكن عملياً تكون الجهات المستثمرة الرئيسية، التي تحمل عدداً كبيراً من الأسهم، هي فقط في موقع يمكنها السيطرة على كيفية إدارة الشركة.

<table>
<tr><th colspan="4">الجدول 13-2: التكاليف[أ] النموذجية ومعدلات النجاح لاكتشاف الدواء</th></tr>
<tr><th>المرحلة</th><th>الكلفة بملايين الدولارات (10^6×$)</th><th>الزمن المستغرق (سنوات)</th><th>معدل النجاح (%)</th></tr>
<tr><td>اكتشاف الهدف</td><td>3.5</td><td>3</td><td>65</td></tr>
<tr><td>الغربلة</td><td>5</td><td>1</td><td>60</td></tr>
<tr><td>الكيمياء الطبية</td><td>7</td><td>1</td><td>50</td></tr>
<tr><td>التطوير قبل السريري</td><td>6</td><td>1</td><td>50</td></tr>
<tr><td>التجارب السريرية – الطور الأول</td><td>10</td><td rowspan="3">5</td><td rowspan="3">25</td></tr>
<tr><td>التجارب السريرية – الطور الثاني</td><td>10</td></tr>
<tr><td>التجارب السريرية – الطور الثالث</td><td>140</td></tr>
<tr><td>المجموع الكلي</td><td>181.5</td><td>11</td><td>50</td></tr>
</table>

(أ) العمود 1: المرحلة خلال عملية اكتشاف وتطوير الدواء (انظر شكل 1.13 و 2.13). العمود 2: الكلفة بالدولار الأمريكي. العمود 3: الزمن المستغرق لهذه المرحلة. العمود 4: معدل النجاح لتلك المرحلة من المشروع. المصدر: جمعت هذه النتائج بواسطة Merlin من عدة شركات صيدلانية 1997-1999.

لغرض تسجيل شركة التقنية الحيوية (أي، وضع اسمها أعلى قائمة الأسهم المتاحة للمتاجرة)، على الشركة أن تبين أنها مستقرة بشكل جيد. وهذا يعني، في

المملكة المتحدة، أنها تمتلك سجلاً تجارياً لعدة سنين، أو أن لها على الأقل منتوجين في مرحلة التجارب السريرية، أو عدداً من المعايير الأخرى. كذلك هو يعني أن الشركة تمتلك نشرة لوصف أعمال الشركة مصدقة بواسطة المحامين لتقول إن كل عبارة فيها صادقة، حتى إلى حد تعريف المصطلحات الكيميائية والطبية. جزء من هذه العملية يتطلب استدعاء مجموعة خارجية من الخبراء لكتابة تقرير عن الشركة، يقولون فيه إنهم خبراء في المجال، وإنهم اتفقوا على أن ما تدعيه الشركة معقول (يعرف هذا بتقرير الخبراء) كما يجب حضور المحاسبين للتدقيق، ويجب أن يوقع مدراء الشركة على أوراق قانونية بأنهم أشخاص مناسبون، ويجب التأكد من عدم ارتكابهم لمخالفات احتيال في الماضي، وهكذا. كل هذا هو لحماية مصالح عامة الناس.

متى، وأين تعوّم شركتك هو فن مبهم. هناك أسواق أسهم عديدة ومختلفة يمكن أن تسجل شركتك فيها (الجدول 2.13). وإن التسجيل في أحد الأسواق لا يعني تسجيل الشركة في أي من الأسواق الأخرى، وذلك لأن لكل منها ضوابط ودساتير مختلفة قليلاً. وعلى الرغم من أن حماسة هذه الأسواق للاستثمارات التقانة الحيوية تقوى وتضعف إلا أن هناك اختلافات بينهم مهمة.

6.4.13 تقييم شركات التقانة الحيوية

Valuing biotechnology companies

يأتي التمويل العام والخاص عن طريق بيع أسهم من شركتك. أنت تبيع جزءاً من الشركة مقابل الحصول على تمويل. ولكن ما هي قيمة أسهمك؟ إذا كان شخص ما مستعد لإعطائك 4 ملايين جنيه، فهل أن هذا المبلغ سيشتري 5% أو 95% من شركتك؟ يعتمد ذلك على قيمة الشركة، وفيما إذا كانت تساوي 80 مليون أو 4.2 مليون جنيه. وعليه فإن تقييم شركتك بالشكل الصحيح مهم جداً.

إن تفاصيل كيفية وضع قيمة لشركة ما هو خارج نطاق هذا الكتاب، وباختصار:

لا توجد طريقة محددة لتقييم شركة ناشئة. لديك بعض الأفكار أو بعض براءات الاختراع، أو بعض الناس، ولكن ليس لديك مبانٍ، ولا منتوجات، ولا

برامج مؤسسة، ولا سجل سابق. العامل الطاغي في هذه الصورة هو وجود فرصة كبيرة لفشل منتوجك الأول علمياً أو تجارياً، وإن هذه الاحتمالية هي مسألة وجهات نظر. وعليه فإن التقييم سيسوده الإحساس بدرجة مصداقيتك.

- عندما تكون الشركة متواجدة في السوق لفترة 3–4 سنوات وفيها 40 مستخدماً ومُنتَجين في مراحل التطوير الأخيرة، يمكننا تقدير قيمتها من خلال حسابنا لقيمة الشركة عندما تصل إلى هدفها النهائي والفرص التي ستصنعها حينذاك. فقد يكون هدفك هو بيع الشركة بـــ 550 مليون دولار أمريكي، أو أن تُصنِّع سلسلة من الأدوية الجديدة التي ستبيعها لشركة صيدلانية كبيرة. سيعطيك هذا رقماً نهائياً وتخمينها للفترة التي ستحتاجها للوصول إلى ذلك. بعد ذلك أضرب هذا باحتمالية الوصول إلى الهدف، وقسِّم الناتج على العائد المتوقع الذي كان بإمكانك كسبه باستثمار نفس الأموال في استثمار "آمن" عبر نفس الفترة الزمنية، وسيكون الناتج هو قيمة الشركة.
- إذا كانت شركتك عامة. فإن قيمتها هي عدد الأسهم المعلقة (Outstanding) مضروباً بالسعر الذي يدفعه الناس بها. يمكن أن يقود هذا إلى فقدان مفاجئ في قيمة شركتك بسبب هبوط سعر السهم، وهذا هو السبب في قول المراسلين الإعلاميين إن هبوط سوق الأسهم أدى إلى مسح بلايين من قيمة صناعة معينة.

5.13 من الذي يحتاج إلى إدارة؟ Who needs management?

وردت كلمة الإدارة عدة مرات خلال هذا الفصل. فما هو سبب تحمس المستثمرين إلى هذا الحد للإدارة؟

إن مستوى ضخامة العمليات التي تجري في الشركة هو أكبر مما هي عليه في مجموعة بحثية. يُتوقَّع لشركة اكتشاف وتطوير دواء أن تنمو إلى 30 – 50 شخصاً خلال 18 شهراً، ومن المحتمل أن تنمو إلى أكثر من 100 شخص في

ثلاث سنوات، وجمعيعهم يعملون على المنتوج نفسه أو مجموعة من المنتوجات لها علاقة ببعضها البعض. لا يمكن حدوث هذا الشيء على طريق الصدفة، وإنما عن طريق التنظيم والترتيب. كذلك يجب التركيز على أهداف خاصة جداً.

يعتمد تمويل الشركة على النجاح وليس على النشاط. فإن كان خط من خطوط البحث لا يعمل فإن أحداً ما يجب أن يتخذ القرارات الصعبة حول ما يمكن عمله بشأن هذه المشكلة، ومن ضمن هذه القرارات، وبدرجتها القصوى، فصل العلماء المشتغلين في ذلك الخط البحثي.

يحتاج هذا إلى إدارة محترفة – أناس يعرفون كيفية تنظيم وتشغيل برنامج علمي بأهداف محددة. ويمكن للعلماء أحياناً أن يلعبوا هذا الدور، وأحياناً أخرى أن يقبلوا باستخدام شخص من خارج الشركة خصيصاً لغرض إدارتها. إن ملء هذا المنصب هو شرط مطلق لبدء شركة، وإن الشركات التي تفتقد إلى إدارة فعّالة غالباً ما تفشل. وفي بعض الأحيان تأخذ الشركة وقتاً طويلاً وكثيراً من الأموال قبل إعلان الفشل. وهذا، هو سبب بحث المستثمرين عن إدارة جيدة كجزء من فريق الشركة، وبدون هذا هناك احتمال كبير لفقدان أموالهم.

يستنكر العلماء أحياناً أن تفرض الإدارة عليهم مطالبها لأنهم متعودون على الحرية الأكاديمية، ولأن ذلك يجعلهم يشعرون بفقدان السيطرة على علمهم. وهذه مغالطة لثلاثة أسباب:

- أنهم لا يفقدون السيطرة على أي شيء – فقبل تأسيس الشركة لم يكن هناك أي شيء لتتم السيطرة عليه. ولم يكن هناك من يطور منتوجاً، أو يستخدم العلماء أو يؤدي العمل.

- إنه ليس بعلمهم يجب أن تتكون الشركة الناجحة من عدة خطوط علمية وتقنية، لأسباب وضحت أعلاه. إنهم مساهمون، وليس هم المؤلفون الوحيدون.

- لا يمكن لشخص واحد السيطرة على شركة صغيرة إذا أريد لها أن تعمل بطاقة ومرونة واندفاع يوصلها إلى النجاح. يجب أن يكون هناك فريق وليس دكتاتورية.

1.5.13 أين الإدارة؟ Where is management?

إن إيجاد إدارة مناسبة هي مهمة صعبة. فإنك بحاجة إلى مختلف أنواع الناس في المراحل المختلفة للشركة. وإن الإدارة العليا، وبالذات المدير التنفيذي، لشركة ناشئة بعشرة موظفين فقط يجب أن يكون قادراً وراغباً في عمل كل شيء، ومستعداً للعمل بدون وجود هيكلية رسمية لحركة التقارير، وعلى معرفة بكل ما يحدث في الشركة. أما مدير عام شركة ذات 400 موظف فإنه يحيل كل ما ذكر أعلاه تقريباً إلى مختص، بينما هو يركز على نظام للتقارير والمسؤولية، متكون من عدة طبقات، تفصل بينه وبين العلماء في المختبر. وكلما كبرت الشركة أصبحت الإدارة فيها أكثر وضوحاً وأفضل هيكلية، وتشمل عدداً أكبر من الناس.

عند توسع الشركة، على الناس الذين أداروا الشركة بشكل جيد جداً في مرحلة ما أن يفسحوا المجال إلى آخرين يكونون أكثر فاعلية في إدراتها خلال المرحلة اللاحقة. وأن أحد المهارات الأساسية في الأشخاص الذين يُنشئون الشركة هي معرفتهم متي يجب استبدال مهاراتهم بمهارات شخص آخر ملائم لتشغيل منظمة أكثر نضجاً.

إن إيجاد الشخص القادر على أداء هذه المهمات المتعددة والمتغيرة في تشغيل شركة ناشئة مهمة صعبة. كما في العلم، فإن الدليل الوحيد على قدرتك القيام بهذا العمل هو سجلك السابق الذي يثبت بأنك قد قمت بهذا العمل سابقاً. والمدير التنفيذي ذو أهمية خاصة، وذلك لأنه (أو لأنها) يملك المسؤولية الكاملة لجعل الشركة تعمل بنجاح. ويأتي المدراء التنفيذيون، لشركات التقانة الحيوية الناشة، من خلفيات متعددة، وتكون خبرتهم في الإدارة وتوجيه العلم وفي استجابتهم لحاجة ومخاوف الهيئة الإدارية للشركة هي التي تؤهلهم للعب هذا الدور. إن البحث الأكاديمي لا يؤهل العالم عادة لمثل هذا الدور. كما لا يصلح الاستشاري

الإداري لذلك (فالذي ينقد أداء شخص ما ليس كالذي يقوم بأداء العمل بنفسه). كما أن الخبرة بالعمل التجاري المتأتية فقط عن طريق الحصول على درجة الماجستير في إدارة الأعمال لا تكون كافية وحدها.

- يمكن تلخيص الاختبارات المهمة لمدير تنفيذي (CEO) لشركة تقنية حيوية ناشئة بالتالي:
- – امتحان مجلة *Nature* (The nature test). هل بإمكانهم قراءة مجلة *Nature* العلمية وفهم ما يقرأون؟ هذا مهم جداً، لأن الأساس في الشركة الناشئة هي العلم الجيد. (ربما لا يكون لهم الزمن الكافي لقراءة هذه المجلة، إلا أن هذه مشكلة أخرى).
- اختبار المصباح (The light bulb test). هل يستطيعون (ويكونون راغبين أيضاً) تغيير المصباح إذا انكسر. أي، هل أنهم مستعدون لعمل أي شيء مطلوب للمحافظة على عمل الشركة. فقد لا يوجد أحد لإصلاح المصباح.
- اختبار راعي القطط (The cat – herder test). أي أن تكون له القدرة على إقناع مجموعة من العلماء المختلفين. إن ما يريده منهم هو أجدى – بالمنظور العلمي مما يريدونه هم.
- اختبار الصفقة (The deal test). هل يمكن للمدير التنفيذي أن يذهب ويعقد صفقات تجلب الأموال للشركة مقابل كمية قليلة من تقنياتها أو منتوجها؟ إن مثل هذه الصفقات مهمة جداً لعملية التمويل، كذلك لكونها تظهر ثقة الآخرين بك.
- اختبار البدلة (The suit test). هل يمكن للمدير التنفيذي ارتداء بدلة عامة ويستطيع إقناع المستثمرين بأنه إلى جانبهم، وأن استثماراتهم أمينة في يديه.

تنطبق هذه المعايير على جميع الأشخاص في المراكز العليا في الشركة الصغيرة. فإن رؤساء أقسام علم الحياة الجزيئي في شركة ناشئة قد يجدون أنفسهم مضطرين لمراقبة المصنع الريادي أو أن يوضحوا لأحد أصحاب البنوك ما معنى DNA، لأن قليلاً من الوظائف تكون أوصافها محددة بشكل دقيق. إن هذا يمثل نصف المتعة فيها.

علاوة على الأشخاص الذين يديرون الشركة ككل، ستحتاج شركتك الناشئة إلى إدارات أكثر تخصصاً من الإدارة المالية وإدارة الأفراد. يتم توفير هذه الإدارات عادة من خارج الشركة، مثل الشركة المضاربة الداعمة للشركة، أو بواسطة المدير التنفيذي في وقت فراغه. وكلما تطورت الشركة ازدادت الحاجة إلى إدارات أكثر تخصصاً، وتكون أقل اهتماماً بالعلم، وأكثر اهتماماً بالإدارة كعملية ومهارة.

يجب أن يدرك العلماء أن هناك حاجة إلى مثل هؤلاء الناس: إنهم لا يستخدمون فقط لجعل حياتك في المختبر أصعب، وإنما بدونهم قد تستيقظ يوماً لتجد أن الشركة قد أفلست.

يقودنا هذا إلى عالم نظرية الإدارة العامة (General management theory) وتطبيقاتها، التي سوف لا نناقشها في هذا الفصل. وهناك العديد من الكتب و"الكورسات" المتوفرة في هذا المجال، بعضها ذو علاقة ببيئة الشركات الصغيرة المعتمدة على العلم.

2.5.13 المدراء والآخرون Directors and others

بحسب القانون يجب أن يكون هناك هيئة إدارية لكل شركة. وإن عمل هؤلاء الناس هو بالضبط، كما يشير إليه اسمهم. وتوجد قوانين متشددة حول ما يمكن ولا يمكن لمدراء الشركة القيام به، علماً أن بعض الفظائع المالية في شركات كبيرة شملت مدراء أساءوا استخدام مناصبهم لصالحهم الخاص.

يجب أن يضيف هؤلاء المدراء قيمة ملحوظة للشركة، وذلك من خلال الاتصالات مع الآخرين والخبرة والنصح والذكاء التجاري. كما يجب أن لا يكون دورهم هو التصديق الأعمى لكلّ ما يريده المدير التنفيذي، ولهذا السبب لا ينصح أن يكون رئيس الهيئة الإدارية هو المدير التنفيذي نفسه. فإن مضارباً رأسمالياً يبحث في تمويل شركة ما، أو عالماً يبحث عن العمل فيها على مستوى عالم أقدم سينظران إلى الهيئة الإدارية لكي يتعرفوا فيما إذا كانت هذه الهيئة هي للزينة أم أنها تعمل بالفعل على مساعدة الشركة لكي تزدهر.

معظم شركات التقانة الحيوية تمتلك، وبصورة موازية للهيئة الإدارية، هيئة إشراف علمية [Scientific Advisory Borad (SAB)] مهمتها نصح المدير التنفيذي والهيئة الإدارية في العديد من النواحي التقنية التي تحتاج الشركة فيها إلى مشورة، وهي توفر بالذات اتصالات ومشورة في جميع مجالات العلم التي قد تكون ذات علاقة بالشركة. فعلى سبيل المثال، قد تحتاج شركة في وراثة المزروعات إلى خبير كيميائي – زراعي (Agrochemical export) وإلى فلاح من بين أعضاء طاقمها.

6.13 براءات الاختراع والتقانة الحيوية Patents and biotechnology

إن براءات الاختراع مهمة جداً للشركات الصغيرة المعتمدة على المعرفة. وإذا توصلت إلى اختراع ولم تحصل له على براءة اختراع، فإن أي شخص آخر وبموارد مناسبة سيكون حراً في تقليده. وبالنسبة إلى شركة صغيرة فإن العديد من المنافسين يتوفر لهم موارد أكثر بكثير من تلك المتاحة لك، وبهذا سيكون من السهولة عليهم أخذ فكرتك واستخدامها. لهذا السبب يكون المستثمرون والإدارات المحترفة متحمسين لحماية ملكيتك الفكرية [Intellectual property (IP)]، بواسطة أسوار قانونية ملائمة وأكثرها ملاءمة هي براءات الاختراع.

إن عملية الحصول على براءة اختراع في المملكة المتحدة هي خارج نطاق هذا الفصل. وباختصار، على العالم – وبإشراف ومساعدة شخص يعرف لغة وقانون براءات الاختراع - أن يقدم (ملفاً) واصفاً الاختراع، إلى دائرة براءات الاختراع. عندها يقوم أشخاص متخصصون من تلك الدائرة بالتأكد من أن براءة الاختراع المقدمة تحقق المعايير الثلاثة المهمة التالية:

- الريادية (Novelty). أي لم يسبق لأحد القيام بها، أو حتى الحديث عنها بشكل معقول.
- المنفعة (Utility). يجب أن تكون لها فائدة ما. مما يعني أن الجين الذي اكتشفته ليس فقط لكونه جيناً جديداً، دائماً يجب أن يكون له علاقة بمنتوج معين.

- المكنة (Enablement). يجب أن تشرح كيف يمكن لشخص ما آخر عملها (بغض النظر عن طبيعتها).

إذا اجتاز طلبك هذه المعايير، عندها تمنح براءة الاختراع. علماً أن العملية تستغرق وقتاً طويلاً، وتكلف مالاً كثيراً. وبالنسبة إلى حقل جديد مثل التقنية الحيوية، هناك نقاشات كثيرة (تجري معظمها في المحاكم). حول ما هو تعريف الاختراع.

الجزء المهم في براءة الاختراع هو الوصف الدقيق بالكلمات للادعاء. والادعاء هو مجموعة من العبارات، توضع عادة في نهاية براءة الاختراع، تُعرف بالضبط ما هو الشيء الذي تريد حمايته في براءة الاختراع. فإذا كان إدعاؤك عاماً، فستنتجح بالحصول على براءة اختراع على عدد من التطبيقات الممكنة لفكرتك، وليس على واحدة فقط. وعليه فإن طريقة كتابة الكلمات هنا مهمة جداً. فمثلاً، مصطلح الحمض النووي أعم وأشمل من الــ (DNA) أو من الجين، وإن جزيئة هي أعم من كحول، وهذه أعم من 2−methybutan−1−ol وهكذا. طبعاً إذا كان إدعاؤك عمومياً بشكل كبير فسوف لا تجيزه دائرة براءة الاختراع لأنه سوف لا يكون جديداً. مثلاً إن استخدام 2 − methylbutan − 1−ol كعلاج للسرطان قد يكون جديداً ورائداً، ولكن استخدام جزيئة فهو بالتأكيد ليس كذلك.

سيكون دورك في براءة الاختراع إذن هو التأكد من دقة وصف اختراعك بخصوص المنتوج النهائي – ففي حالة تحديد تتابع الجين، قد يكون المنتوج النهائي هو تشخيصي لنقص وراثي أو لدواء يمنع فعل الناتج البروتيني لذلك الجين – وبالشروط التي تتوافق مع المعايير أعلاه.

يمكن لوكيل براءات الاختراع الجيد أن يكون مفيداً جداً في هذه العملية، وبالتالي فإن مساعدتهم مطلوبة.

7.13 الاستنتاج: عبور الحاجز (تخطّي الصعوبات)

Conclusion: jumping the fence

إن هذا الفصل ليس عن إنشاء شركات جديدة. إن الشخص الذي ينشئ شركة جديدة هو شخص له قدرة على إيجاد طريقة تجعل كل ما وصفناه أعلاه

قابلاً للحدوث، وأن يعمل على تحقيقه. إن إيجاد الطريقة تحتاج إلى المعرفة وسعة الخبرة والاتصالات، أما العمل على تحقيق الهدف فهو الأكثر أهمية ويمكن إنجازه بثلاث كلمات هي إعمال الشيء فقط (Just do It). إن ثلاث كلمات لا تصنع فصلاً في كتاب، لذا فقد ركزنا على ما يجب على الشخص المؤسس عمله لإيجاد تجارة تقنية حيوية ناجحة، ولم نركز عدة مرات على طبيعة الناس المشتركين بالعملية، وليس على العملية التي ستقودهم بهدوء وحتمية إلى النجاح.

إن الزمن الحالي هو الزمن المفضل وبشكل كبير للشركات الجديدة والسريعة النمو في مجال التقنيات المتقدمة. إن الجميع، من مستثمرين ومشرعين وحكومات يريدون رؤية شركتك الصغيرة ناجحة. كما إنه وقت غير مسبوق في التغير التقني في علوم الحياة. وبالرغم من حالات الفشل التجاري وسوء الفهم من عامة الناس، فإن صناعة التقانة الحيوية ستستمر بكونها مجالاً تجارياً ديناميكياً ومثيراً، مثل أي مجال تجاري آخر، خلال العقد القادم. إنها بيئة رائعة للعالم أن يدخلها حيث العلم الجيد وإمكانية المكافأة المادية الجيدة ولأجل متعة العمل.

8.13 قراءات إضافية Further reading

Southon, M. and C. West. *The Beermat Entrepreneur: Turn your Good Idea into a Great Business*. Harlow: Pearson Education, 2002.

Robbins, C. *From Alchemy to IPO: The Business of Biotechnology*. New York: Perseus Publishing, 2001.

Ernst and Young. *Beyond Borders: A Global Perspective, 2004 Biotechnology Report*. New York: Ernst and Young, 2004.

Useful Websites

Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI), <http://www.abpi.org.uk>.

Bioindustry Association, <http://www.bioindustry.org/index.shtml>

British Venture Capital Association, <http://www.bvca.co.uk>.

The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA), <http://www.phrma.org>.

الفصل الرابع عشر

الأحماض الأمينية

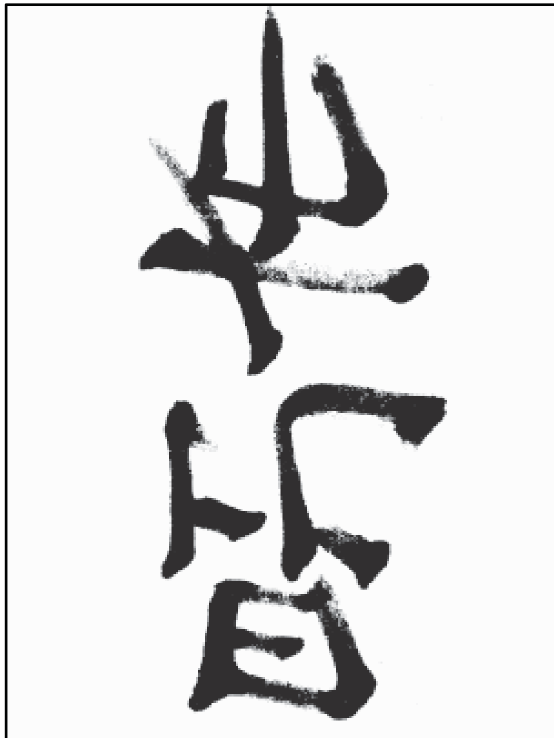
Amino Acids

ل. إيجيلينغ	L. Eggeling
مركز بحوث جولج، ألمانيا	Research Centre Jülich, Germany
دبليو فيفرل،	W. Pfefferle
و	and
ديغوسا أ.ج، ألمانيا	Degussa AG, Germany
و	and
هــ. سام	H. Sahm
مركز بحوث يوليش، ألمانيا	Research Ceutre jülich, Germany

1.14 المقدمة Introduction

بدأت قصة إنتاج الأحماض الأمينية في اليابان عام 1908 عندما كان الكيميائي الدكتور إيكيدا (Dr. K. Ikeda) يعمل على مكونات النكهة لعشبة البحر السمراء (Kelp). إن الطعم الخاص لمستحضرات عشبات البحر الأخرى مثل كومبو (Kombu)، وكاتسوبوشي (Katsuobushi)، في الأطعمة مرغوبة وشائعة لدى اليابانيين (الشكل 1.14). بعد عملية التحلل الحمضي والتجزئة لعشبة البحر (Kelp)، اكتشف دكتور إيكيدا أن أحد الأجزاء التي عزلها يتكون من حمض الجلوتاميك (Glutamic acid)، الذي يطور طعماً لذيذاً وجديداً بالكامل بعد

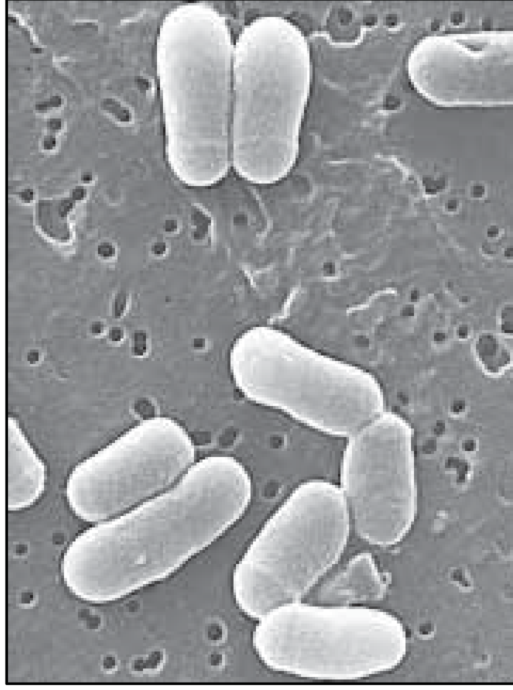
معادلته بالصودا الكاوية (Caustic soda). كان ذلك يمثل ميلاد استخدام الغلوتامات أحادي الصوديوم (Monosodium glutamate) كمركب محسن للطعم. بعد ذلك بفترة وجيزة بدأت شركة Ajinomoto Co.Ltd بإنتاج هذه المادة (Monosodium glutamate-MSG) تجارياً عن طريق عزلها من البروتينات النباتية مثل بروتينات الصويا أو الحنطة.



الشكل 1.14 الإيديوغرام أو اللوغوغرام(*) وهي تمثل صورة Kombu كما تظهر على تحضيرات عشبة البحر، الذي يستخدم كعنصر من عناصر نكهة الغذاء. ويعود الفضل في هذه اللوحة إلى الدكتور. ت. إيكيدا (Ajinomoto)، حفيد الدكتور ك. إيكيدا.

هذا ويذكر أن كمية الفضلات المتكونة خلال هذه العملية كانت عالية، كما أن التخليق الكيمياوي لمادة D,L-glutamate كان ذا استخدامات قليلة لأن أملاح الصوديوم في النظير المتجازئ (D-isomer) يكون عديم الطعم.

(*) الإيديوغرام (Ideogram) أو اللوغوغرام (Logogram) وهي علامة تمثّل كلمة كاملة (المترجم)



الشكل 2.14 صورة مجهرية إلكترونية لــ *Corynebacterium glutamicum* تبين شكل -V النموذجي لخليتين نتيجة لانقسام الخلايا.

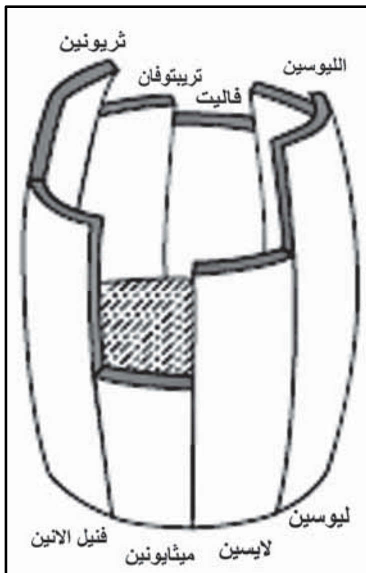
ثم حصل الإنجاز الكبير في إنتاج MSG بعد عزل بكتريا معيّنة من قبل كل من Dr S.Udaka و Dr. S. Kinoshita في Kyowa Hakko Kogyo، عام 1957. قام هذان الباحثان بغربلة الكائنات المجهرية الفارزة للأحماض الأمينية، واكتشفا أن العزلة المرقمة No. 534 النامية على وسط نمو من الأملاح المعدنية تفرز L-Glutamate واتضح لهما لاحقاً أن إفراز L-Glutamate يحفز عندما يكون تجهيز البايوتين (Byoten) غير كافٍ. هذا الكائن المجهري هو *Corynebacterium glutamicum* (الشكل 2.14). وهي بكتريا موجبة لصبغة غرام، يمكن عزلها من التربة. وهي تمثل مع الأجناس الأخرى مثل *Sterptomyces*، *propionibacterium* أو *Arthrobacter* المجموعة العائدة إلى مجموعة الــ *Actinomyectes* موجبة صبغة غرام. إن النجاح التجاري في إنتاج MSG بواسطة هذه البكتريا وفّر دفعة قوية لإنتاج الحمض الأميني باستخدام

C.glutamicum وبعد ذلك باستخدام أنواع بكتريا أخرى مثل بكتريا *E.coli*. كذلك، تطور إنتاج النيوكليوتيدات (Nucleotide) سنة 1970 مع *C.ammoniagenes* القريبة من *C. glutamicum*. إن توفر طوافر البكتريا المنتجة، وتطور عملية الإنتاج أوجدا حاجة إلى أجهزة تخمر متطورة. وبالتالي فإن تطور تقانة الأحماض الأمينية كان حافزاً إلى صناعة التخمير بشكل عام.

2.14 الاستخدام التجاري للأحماض الأمينية

Commercial use of amino acids

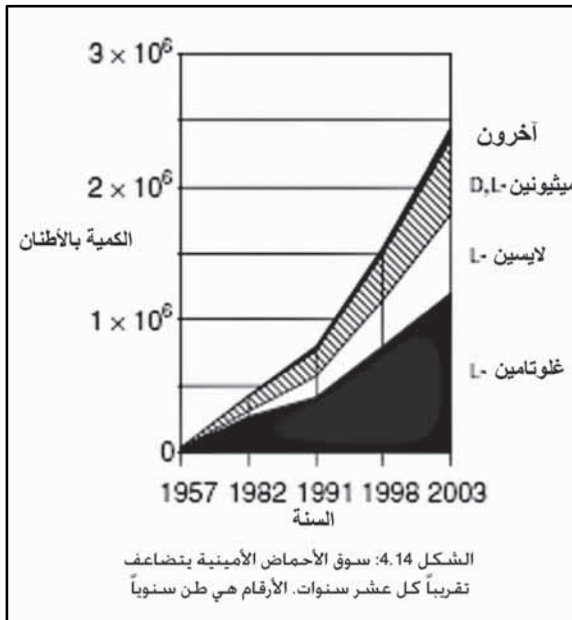
تستخدم الأحماض الأمينية لأغراض مختلفة. فعلى سبيل المثال تحتاج الصناعة الغذائية إلى L-Glutamate كمحسن نكهة، وإلى Glycine كمُحّلي للعصائر (الجدول 1.14). أما الصناعة الصيدلانية فتحتاج إلى الأحماض الأمينية في الحقن الوريدية (Infusions)، وبالأخص الأحماض الأمينية الأساسية، أو تحتاجها في أغذية الحميّة (Dietary) خاصة. أخيراً، وليس آخراً، هناك سوق كبير لاستخدام الأحماض كإضافات علفية، ويعود السبب في ذلك إلى أن العلف الحيواني، النموذجي، مثل علف فول الصويا للخنازير، يكون فقيراً بالأحماض الأمينية الأساسية، مثل الميثايونين (Met) واللايسين (Lys). تجد هذا موضح بالشكل (3.14) حيث توصف القيمة الغذائية لعلف فول الصويا ببرميل مجزأ، وتحدد استخدام البرميل كاملاً بواسطة الضلع الأقصر، الناقص، أي بواسطة الضلع الذي يمثل الميثايونين. و عليه تضاف الأحماض الأمينية الأخرى



الشكل 3.14 البرميل يمثل القيمة الغذائية لمسحوق فول الصويا المحدود أولاً بمحتواه من المثايونين

لزيادة فعالية العلف. إن إضافة 10 كغم فقط من الميثايونين للطن الواحد من العلف سيزيد من نوعية البروتين بنفس المستوى الناتج من إضافة 160 كغم من وجبة فول الصويا أو 56 كغم من وجبة السمك. إن أول الأحماض الأمينية المحدودة في العلف الذي يعتمد على المحاصيل النباتية والبذور الزيتية هو الحمض الأميني L-methionine، يتبعة في ذلك L-Lysine ومن ثم L-Thrionine أو (Thr).

الناحية المهمة الأخرى في الأعلاف المدعمة هي أن استخدام علف يحتوي على مكونات متوازنة من الأحماض الأمينية ينتج منه فضلات حيوانية ذات محتوى نتروجيني أقل (وذلك لأن مزيداً من النتروجين الموجود في العلف المحسن سيتم استخدامه من قبل الحيوان) مما يقلل من التلوث البيئي. ولقد ازدادت الحاجة إلى الأحماض الأمينية زيادة كبيرة خلال العقود الثلاثة الماضية. من المعروف أن سوق الأحماض الأمينية ينمو وبثبات بنسبة 5−10% بالسنة. وبهذا، فإن السوق قد تضاعف تقريباً خلال عشر سنوات (الشكل 4.14). وأن بعض الأحماض الأمينية، مثل L-Lysine المطلوبة كإضافات علفية، قد أظهر زيادة كبيرة. ولقد ازداد السوق العالمي لهذا الحمض الأميني بأكثر من عشرين مرة خلال العقدين الماضيين.



الشكل 4.14: سوق الأحماض الأمينية يتضاعف تقريباً كل عشر سنوات. الأرقام هي طن سنوياً

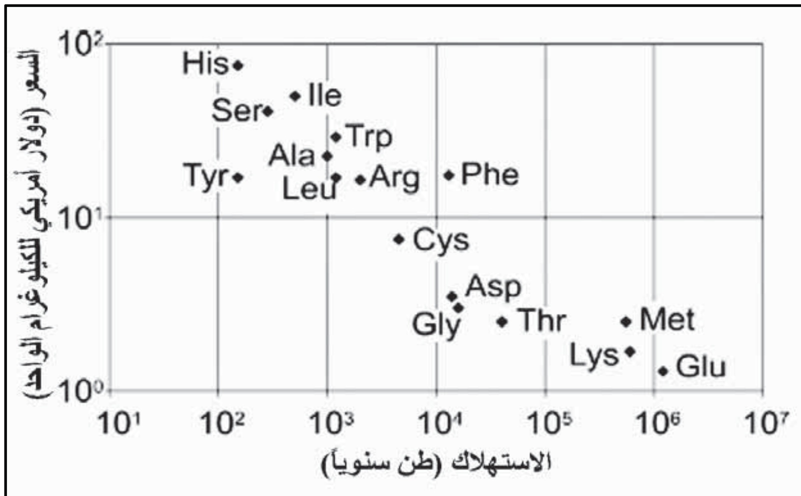
كما ظهرت أنواع أخرى من الأحماض الأمينية في الأسواق مثل الثريونين، L-thrionine والأسبارتات L-aspartate والفينل ألانين L-phenylalanine، حيث يستخدم الحمضان الأخيران في تخليق مادة التحلية المسماة Aspartame. والجدول (1.14) يوضح تقديرات للطلب العالمي لأهم الأحماض الأمينية. هذا

ولازال L-glutamate يشغل المنصف الأول، يتبعه في ذلك L-lysine و D,L Methionine –، في حين تأتي بقية الأحماض الأمينية بعد ذلك وبفارق كبير.

الجدول 1.14: كميات الأحماض الأمينية المنتجة حالياً

ضخامة الإنتاج (طن/سنة)	الحمض الأميني	طريقة الإنتاج المفضلة	الاستخدام الرئيسي
1200000	حمض L – جلوتاميك	التخمير	محسن نكهة
600000	L – لايسين	التخمير	إضافات علفية
550000	D، L – ميثايونين	التخليق الكيمياوي	إضافات علفية
40000	L – ثريونين	التخمير	إضافات علفية
16000	جلايسين	تخليق كيمياوي	إضافات غذائية، مادة محلية
14000	L – أسبارتات	تحفيز أنزيمي	أسبارتام،
13000	L – فينايل ألانين	التخمير	أسبارتام، بوليمر
4500	L – سيستيين	استخلاص، التخمير	إضافات غذائية
3500	L – أرجنين	استخلاص، تخمير	سيستيين، مواد صيدلانية
2000	L – أرجنين	تخمير، استخلاص	مواد صيدلانية
1500	ألانين	تخمير، استخلاص	مواد محلية، وحدان بناء
1200	L – تريبتوفان	تخمير	أعلاف، مواد صيدلانية
1200	L – لوسين	تخمير، استخلاص	مواد صيدلانية
1000	L – فالين	تخمير، استخلاص	مبيدات حشرية، مواد صيدلانية
500	L – أيسولوسين	تخمير، استخلاص	مواد صيدلانية

هنالك علاقة وثيقة بين سعر الأحماض وديناميكية السوق. ويمكن لتقنيات التخمير الأكثر كفاءة أن توفر منتوجات أرخص، وبالتالي تؤدي إلى زيادة في الطلب. وهذا سيقود إلى الإنتاج بكميات أكبر، مما يختزل التكاليف أكثر. ومع أن تجهيز الأحماض الأمينية، مثل L-Lysine، كإضافات علفية هو في حالة تنافس مباشر مع وجبة فول الصويا (مصدر L-lysine) إلا أن هنالك تغايرات كبيرة في الحاجة إلى الحمض الأميني، متعلقة بكمية إنتاج نباتات المحاصيل. إن الأحماض الأمينية التي تنتج بكميات كبيرة تكون أرخص سعراً (الشكل 5.14). كما أن الأسعار المنخفضة تحدد مواقع مصانع الإنتاج. وإن العوامل الرئيسية التي تحدد موقع مصنع الإنتاج هي سعر مصدر الكربون والسوق المحلية. فالمصانع الكبيرة لإنتاج L-Glutamate تنتشر في مختلف مناطق العالم، ولكن بتركيز أكثر في مناطق الشرق الأقصى مثل تايلاند وأندونيسيا. أما بالنسبة إلى الــ L-lysine فإن الوضع مختلف. وبما أن ثلث السوق العالمية لهذا الحمض يوجد في أمريكا الشمالية، وإن هناك وفرة من الذرة كمواد علفية يمكن استخدامها في عملية التخمير، فيتركز حوالى ثلث المصانع الإنتاجية في تلك المنطقة. وفي كل الحالات تقريباً، تكون الشركات المنتجة للــ L-lysine مرتبطة مع صناعة الذرة. وهذا يوضح حقيقة أن الإنتاج التجاري للأحماض الأمينية هو حقل سريع النمو، ويتغير مع العديد من المتداخلات العالمية.



الشكل 5.14: الأحماض الأمينية في أكبر الأسواق هي الأرخص.

3.14 طرق وأدوات الإنتاج Production methods and tools

يمكن تركيب بعض الأحماض الأمينية كيميائياً مثل الجلايسين (Glycine) الذي ليس له مركز كيميائي مجسم (Stereochemical center) أو الــ D,L-Methionine الذي يحتوي على الكبريت، والذي يضاف إلى العلف على شكل خليط راسيمي (Racemic mixture) لأن الحيوانات تمتلك الأنزيم أوكسيداز المؤكسد للأحماض من شكل D (D-amino acid oxidase) الذي يعمل مع فعالية الترانس أمينيز (Transaminare) على تحويل D-Methionine إلى شكل L الفعّال غذائياً. إن الطريقة التقليدية لعزل الحمض الأميني من البروتينات بواسطة التحلل الحمضي لازالت تستخدم لأحماض أمينية مختارة لا تحتاجها السوق بكميات كبيرة (الجدول 1.14). أما الطريقة الأخرى فتستخدم مواد التحويل والمواد المولدة(*) (Precursor) بالتعاون مع البكتريات أو طريقة التركيب الأنزيمي. هذا، وإن الطريقة المناسبة لإنتاج الأحماض الأمينية من شكل L المطلوبة بكميات كبيرة هي بطريقة الإنتاج التخميري باستخدام بكتريا مهندسة وراثياً.

الطرق التقليدية لتطوير سلالات البكتريا Classical strain development

الآليات التنظيمية Regulatory mechanisms

لا تفرز البكتريا عادة الأحماض الأمينية بكميات عالية لأن آليات التنظيم (Regulatory mechanisms) تسيطر على عملية تركيب الأحماض الأمينية بصورة اقتصادية بحيث إن حاجة الخلية (لتخليق البروتين) توافق بالضبط عمليات التركيب. ولا يوجد فائض من الأحماض الأمينية وإنما هناك خليط قليل منها داخل الخية ليلبّي حاجة الخلية الآنية. وبهذا، يجب توليد طوافر قادرة على تصنيع حمض أميني معين بكميات كبيرة: ثم اشتقاق عدد كبيرة من سلالات البكتريا المنتجة للأحماض الأمينية باستخدام برامج التطفير والغربلة. لقد شملت هذه البرامج التطبيقات التالية:

(*) Precursor أو المادة المولدة هي مادة تشكل منها مادة أخرى (المحرر).

- التطفير العشوائي، (Undirected mutagenesis)
- انتقاء شكل مظهري (Phenotype) معين،
- وانتقاء الطفرة التي تعطي أفضل إنتاج للحمض الأميني.

بعد انتقاء أفضل سلالة منتجة يعاد استخدام الطريقة أعلاه مرة بعد أخرى لزيادة إنتاجية السلالة في كل مرّة، ولغاية الحصول على السلالة المناسبة للطرق الصناعية الملائمة (الجدول 2.14). وبسبب عمليات تحديد الظروف المثلى للإنتاج التي جرت خلال عدة عقود، يتوفر الآن مجموعة من السلالات ذات الأداء العالي الممتاز. علماً، أنه وبسبب خطوات التطفير المتكررة، فإن السلالات الناتجة قد تحمل أيضاً طفرات أخرى، إضافة إلى الطفرة المرغوبة. وقد تكون هذه الطفرات الإضافية ذات خواص غير جيدة كتلك التي تؤثر في النمو أو تبطىء من عملية تحويل السكر إلى حمض أميني. إن السرعة ضرورية، طبعاً، لاختزال زمن التخمير، وبالتالي زيادة العدد الكلي لدورات التخمير في وحدة الزمن لغرض الحصول على أكبر ربحية عمل من أجهزة التخمير المتاحة.

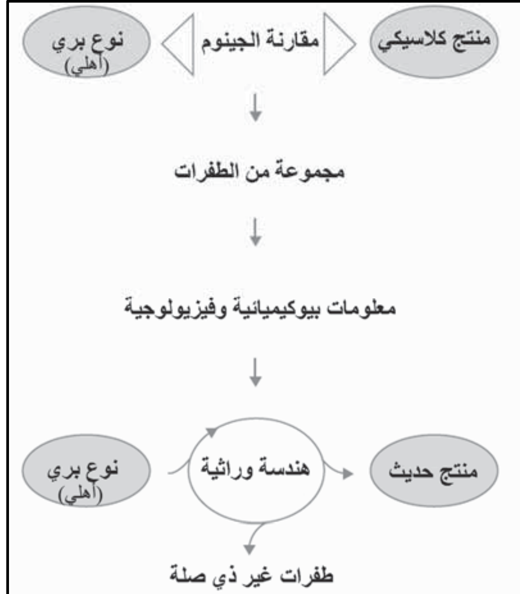
الجدول 2.14: السلالات المستحصلة بواسطة طرق التطفير والغربلة التقليدية، تظهر المحصول المحسن وبعض الصفات المظهرية للطفرات

السلالة	الصفة	العطاء من L-Lysine (%)
Aj 511	نوع بري	0
Aj 3445	AEC^r	16
Aj 3424	AEC^r Ala^-	33
Aj 3796	AEC^r Ala^- CCL^r	39
Aj 3990	AEC^r Ala^- CCL^r ML^r	43
Aj 1204	AEC^r Ala^- CCL^r ML^r FP^s	50

AEC^r = مقاومة إلى S-(aminoethyl) – L- Cysteine ، Ala^- = تحتاج إلى L-alanine – CCL^r مقاومة إلى α−Chlorocaprolactam ؛ML^r= مقاومة إلى δ− methyl-L-lysine ، و FP^s = حساسة إلى β−Fluoropyruvate.

تقنيات الجينوم Genomic techniques

لأجل التخلص من الطفرات غير المرغوبة، فإنه من الشائع هذه الأيام القيام أولاً بمقارنة تتابع الجينوم في السلالة المنتجة بتتابع الجينوم في النوع البري (Wild type) ومن ثم إحداث الطفرات المرغوبة فقط بواسطة الهندسة الوراثية، مع سرعة عالية في تحويل السكر من أجل إنتاج سلالة أبسط وأكثر فعالية (انظر الشكل 6.14). من أدوات الجينوم الأخرى استخدام تقنية الصفيفة المجهرية للـ DNA (DNA Microarray) لتحديد السلالات المنتجة ذات الكفاءات المختلفة وبسرعة، أو لكي تحدد الاختلافات في عمليات التخمير، وبذلك ستنتج تحسينات إضافية مما يدعم من عملية الإنتاج ككل.



الشكل 6.14 مقارنة الجينوم البري مع ذلك النوع من المنتج الكلاسيكي الذي يسمح بتحديد الطفرات اللازمة وبناء منتج بدون الطفرات المتأصلة في السلالة الكلاسيكية الضارة للاستهلاك العالي من السكر، ومعدلات إفراز المنتجات.

تحليل الدفق الداخل خلوي Intracellular flux analysis

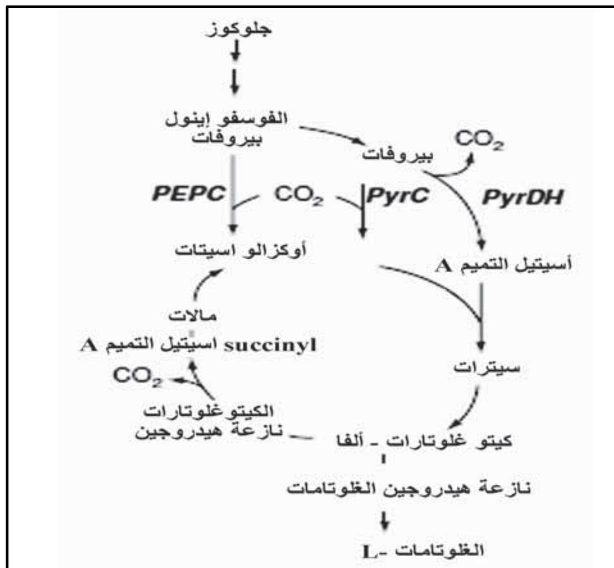
إن قياس دفق الكربون داخل الخلية الحية هو أسلوب مختلف تماماً في عملية تطوير السلالات. ولقد أنجز حديثاً تقدم كبير في تطوير التقنيات القديمة للتعليم بالنظائر المشعة (Isotope labeling technique). وبالذات، في طرق

المطياف الضوئي باستخدام ^{13}C-NMR حيث يمكن الآن قياس الدفق الداخل خلوي بدقة عالية، وقد أصبح على سبيل المثال ممكناً قياس الدفق الرجعي (Back fluxes) في بكتريا *C.glutamicum* وكما هو موجود في التفاعلات المكملة (Anaplerotic). الطريقة مشروحة بالتفصيل في الفصل الثاني من هذا الكتاب. وإن قياس الدفق يساعد بشكل كبير في انتقاء التفاعلات في عملية الأيض المركزية الواجب تحويرها بواسطة الهندسة الوراثية.

4.14 L – الغلوتامات L-Glutamate

1.4.14 الكيمياء الحيوية Biochemistry

كما ذكر سابقاً، فإن L– غلوتامين كان أول حمض أميني تم إنتاجه. وتستخدم بكتريا *glutamicum* لإنتاجه. وتستخدم هذه البكتريا دورة تحلل الغلايكول (Glycolysis) لتزويد المسار الأيضي بالطاقة، وتستخدم كذلك مسار فوسفات البنتوز (Pentose phosphate) ودورة حمض السيتريك لتكوين المولدات الأيضية واختزال نيوكلوتيدات البايريدين (Pyridine nucleotides) (الشكل 7.14).



الشكل 7.14 رسم للتفاعلات الأيضية الرئيسية لــ *C.glutamicum* تتصل بدورة حمض الستياريك وذات صلة بإنتاج L– غلوتامات PyrDH، نازعة البيروفات؛ PyrC، كربوكسيلاز البيروفات؛ PEPC، كربوكسيلاز الفسفوإينول بيروفات.

تظهر هذه البكتريا مواصفات خاصة في التفاعلات المكملة، ولكن، بما أن L-Glutamate يشتق مباشرة من α−Ketoglutarate، فإن أحد متطلبات الإنتاج العالي للغلوتامات هو توفر قابلية تغذية عالية لدورة حمض الستريك (Citric acid). كان يعتقد أول الأمر أن أنزيم (Phosphoenolpyruvate carboxylase-PEPC) هو وحده الذي يعمل كأنزيم كاربوكسيليز في هذه العملية. علماً، أن البحوث الجزيئية وبالارتباط الوثيق مع استعمال دراسات التعليم الأشعاعي بـــ C^{13} أظهرت وجود تفاعل لأنزيم كاربوكسيليز آخر. وقد أدى البحث عن هذه الفعالية الأنزيمية إلى الكشف عن فعالية أنزيم (Pyruvate carboxylase-PyrC)، وتحديد الجين المسؤول عنه. وبهذا، فإن بكتريا *C.glutamicum* تحتوي على أنزيم (Pyruvate dehydrogenase-Pyr DH) الذي ينقل AcetylCoA إلى دورة حمض الستريك، وعلى أنزيمين يجهزان مادة الــ Oxaloacetate، وهما: (Pyrc) Pyruvate carboxylase و Phosphoenoloyruvate carboxylase (PEPC) (الشكل 7.14) وكلا الأنزيمين يمكنهما إحلال أحدهما مكان الآخر لضمان تحويل وحدات ثلاثي الكربون إلى أوكز الواسيتيت (Oaloacetate). إن هذا يختلف عمّا هو موجود في بكتريا *E-coli* التي تحتوي على أنزيم PEPC فقط لإتمام هذه العملية، ويختلف أيضاً عن بكتريا B. subtilis التي تحتوي على الأنزيم Pyruvate carboxylase فقط. وبما أن *C.Glutamicum* تحتوي على كلا الأنزيمين فإنها تتصف بمرونة عالية جداً في إعادة تزويد المواد الوسطية في دورة حمض الستريك في حالة نفاذها.

تُحفَّز عملية تحويل α−Ketoglutarate إلى L-Glutamate بواسطة الأنزيم Glutamate dehudrogenase. يتكون هذا الأنزيم من عدة وحدات ثانوية، ويبلغ الوزن الجزيئي لكل من هذه الوحدات الثانوية 49.00 والتون. وللأنزيم فعالية خصوصية عالية جداً تبلغ 1.8 ملي مول/دقيقة/لكل ملغم بروتين، ويتواجد L− غلوتامات في الخلية بكثافة عالية بحوالى 150 ملي مول. وفي حالة الأحماض الأمينية الأخرى نجد أن كثافته داخل الخلية تكون عادة أقل من 10 ملي مول. إن الكثافة العالية تضمن التجهيز المباشر للــ L− غلوتامات المطلوب لعملية التخليق الخلوي، وكذلك لتجهيز المجاميع الأمينية (Amino groups) عن طريق

تفاعلات أنزيم Transaminase، وإلى تفاعلات خلوية مختلفة. إن حوالى 70% من المجاميع الأمينية في الخلية تنشأ من L- غلوتامات.

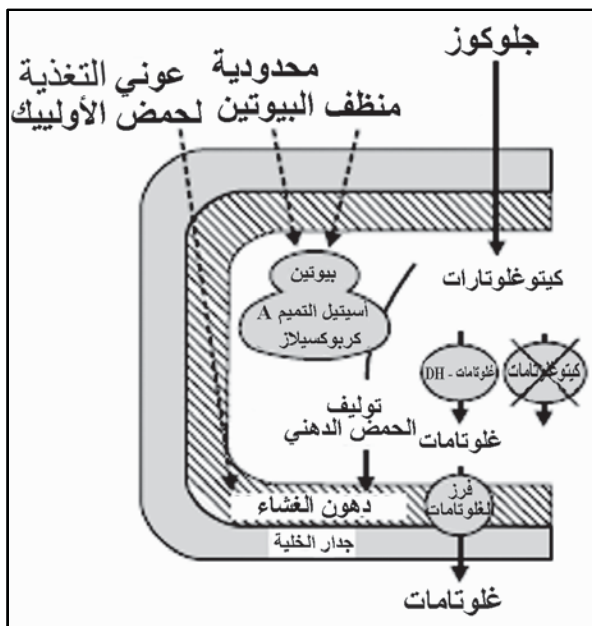
2.4.14 سلالات الإنتاج Production strains

لغرض إنتاج L- غلوتامات بطرق التقانة الحيوية، يجب تحرير الحمض الأميني المخلّق داخل الخلية إلى خارج الخلية، ويتطلب هذا معاملة خاصة تؤدي إلى تصدير الحمض الأميني إلى خارج الخلية بوساطة ناقل مفترض. هذا ومن الضروري وجود ناقل متخصص، وإلا فبالإضافة إلى L- غلوتامات المشحون، سترتشح مواد أيضية أخرى وأيونات إلى خارج الخلية مسببة موت الخلية. علماً أن عملية تخليق L- غلوتامات لازالت غير مفهومة بالكامل، ويعود السبب في ذلك إلى وجود مدى واسع من المعاملات التي تؤدي إلى إفراز الغلوتامات. تشمل هذه المعاملات:

(1) النمو تحت ظرف من البايوتين محدد، (2) إضافة البنسلين، (3) إضافة اللايسوزايم (Lysozyme)، (4) إضافة المواد الخافضة للتوتر السطحي (Surfactants)، (5) استخدام طوافر غذائية (Auxotrophs) لحمض الأولييك (Oleic acid)، (6) استخدام طوافر غذائية للجليسرول. يبدو أن جميع هذه المعاملات تستهدف جدار الخلية أو الغشاء الدهني بطريقة أو بأخرى. علاوة على ذلك فإن تركيب الدهن الفوسفاتي (Phospholipid) يتغير كثيراً في حالة غياب البايوتين، وعليه فإن هناك علاقة تنشأ بينه وبين:

- عدم انتظام جدار الخلية
- تركيب الدهونات في الغشاء،
- والناقل المفترض المتواجد في الغشاء.

أحد النماذج المحتملة موضح بالشكل (8.14) وهو يوضح العلاقة بين التأثير التقليدي للبايوتين وإفراز الغلوتامين. إن البايوتين يعمل كأنزيم مساعد (Coenzyme) لأنزيم Acetyl –CoA carboxylase وبهذا فإنه يشترك بصورة مباشرة في تخليق الحمض الدهني (Fatty acid).



الشكل 8.14 نموذج لعمل مجموعة مختارة من التقنيات (سهام متقطعة) للحث على إفراز L-glutamate المرتبط بغلاف الخلية. معروض أيضاً تدفق من الجلوكوز إلى L-glutamate خارج الخلية بواسطة حامل تصدير (Export carrier).

تحت ظروف تحديد البايوتين تقل محتويات الغشاء من الـــ Phospholipids بشكل كبير من 32 إلى 17 نانومول/ملغم، ويزداد محتوى حمض الأولييك (Oleic acid) غير المشبع بـــ 45%. إن هذا التركيب الدهني المختلف يوفر بيئة دهنية مفضلة للناقل وبهذا يزداد إفراز L-glutamate. ويؤثر تركيب الغشاء بنفس الطريقة في الطفرات الغذائية (Auxotrophic mutants)، لحمض الأولييك أو الجليسرول. إن إضافة المواد المقلصة للتوتر السطحي تؤثر أيضاً في فعالية أنزيم Actetyl-CoA Carboxylase لأن إضافتها تؤدي إلى فك ارتباط هذا المعقد الأنزيمي المتعدد. إن التركيبة المتغيرة للأحماض الدهنية في الغشاء يحفز الناقل ليكون أكثر فعالية، وبالتالي يتم إفراز L-Glutamate.

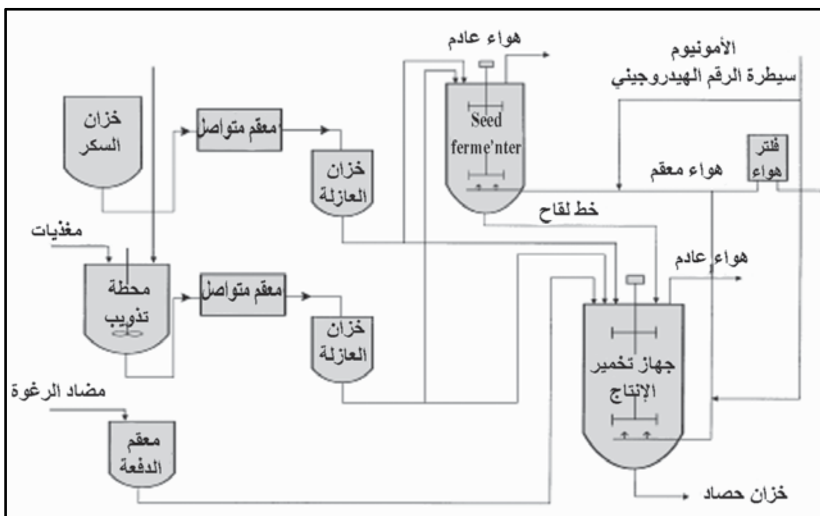
وبصرف النظر عن عملية التصدير، وارتفاع نشاط الغلوتامات ديهايدروجيناز (Glutamate dehydrogenase)، هنالك عنصر ثالث في إنتاج L-glutamate وهو ألفا كيتوغلوتارات ديهايدروجيناز (α-ketoglutarate dehydrogenase) (الشكل 7.14). تعمل هذه الظروف غير الطبيعية على إنتاج فيض من الغلوتامات (L-glutamate) ولكنها تقلّل أيضاً من نشاط هذا الأنزيم.

إن تعريض الخلية إلى التوتر السطحي، أو البنسلين، أو البيوتين المحدود، يقلل من نشاط الأنزيم ألفا- كيتوغلوتارات ديهيدروجيناز ليصل إلى مستوى نشاط يقل عن 10% فقط، في حين لا يتأثر نشاط الغلوتامات ديهيدروجيناز. ولهذا السبب أيضاً ينخفض نشاط α – كيتوغلوتارات ديهيدروجيناز المنافس، فيمنع تحويل الفائض من α – كيتوغلوتارات إلى التميم الأنزيمي (Succinyl-CoA)، ومن ثم إلى L-glutamate.

3.4.14 عملية الإنتاج Production process

إن أكثر العوامل المؤثرة في تكوين L- غلوتامات (L-glutamate) هي: تركيز الأمونيوم، وتركيز الأكسجين المذاب، والرقم الهيدروجيني PH. وعلى الرغم من أن الكميات الكبيرة من الأمونيوم تكون ضرورية لعملية تحويل السكر إلى L – غلوتامات، إلا أن التركيز العالي من هذه المادة يكون مثبطاً للنمو وكذلك لإنتاج L – غلوتامات. ولهذا السبب يضاف الأمونيوم بتراكيز قليلة في بداية التخمير، ومن ثم تستمر إضافته تدريجياً خلال فترة التخمير.

أما تركيز الأكسجين فيبقى تحت السيطرة، وذلك لأنه تحت ظروف عدم كفاية الأكسجين سيكون إنتاج L- غلوتامات فقيراً، كما سيتراكم كل من حمض اللاكتيك وحمض السكسنيك، في حين تؤدي زيادة تركيز الأكسجين إلى تراكم ألفا- كيتوغلوتارات (α-Ketoglutarate) كناتج عرضي. يوضح الشكل (9.14) مخططاً للعملية.



الشكل 9.14 مخطط لتدفق المواد في مصنع لإنتاج L– غلوتامات.

بالنسبة إلى عملية التخمير نفسها، تنمى السلالة المنتجة في مخمرات قد يصل حجمها إلى $500\ m^3$ (الشكل 10.14) وبعد عملية الاستنبات (Cultivation)، تتم السيطرة على إفراز L– غلوتامات عن طريق إضافة المواد الخافضة للتوتر السطحي مثل (Polyoxy ethylene sorhitan monopalmitate (Tween 40)، ولقد تم تسجيل محصول من L – غلوتامات، بنسة 60 إلى 70% اعتماداً على الجلوكوز المستعمل. وسيحتوي مرق التخمير في نهاية عملية التخمير على L – غلوتامات على شكل أملاح الأمونيوم. ومن خلال عمليات أسفل المجرى (Downstream) النموذجية اللاحقة، يتم فصل الخلايا عن المرق الذي يمرر خلال راتنج (Resin) ومبادل أنيوين سالب، ترتبط فيه الأنيونات السالبة لـــ L – غلوتامات في حين تتحرر الأمونيا. هذا ويمكن استرجاع هذه الأمونيا عن طريق التقطير، ومن ثم يعاد استخدامها في التخمير. تتم عملية الاستخلاص (Elution) باستخدام NaOH لتكوين الغلوتامات أحادي الصوديوم Monosodium glutamate (MSG) بصورة مباشرة في المحلول ولتجديد المبادل الأنيوني كذلك، ثم يمكن بعد ذلك بلورة MSG المستخلص بصورة مباشرة. يُتبع ذلك خطوات تهيئة أخرى مثل قَصر اللون (Decolorization) أو القصر والغربلة (Sieving) معاً لإنتاج نوعية مقبولة الاستعمال في الغذاء.



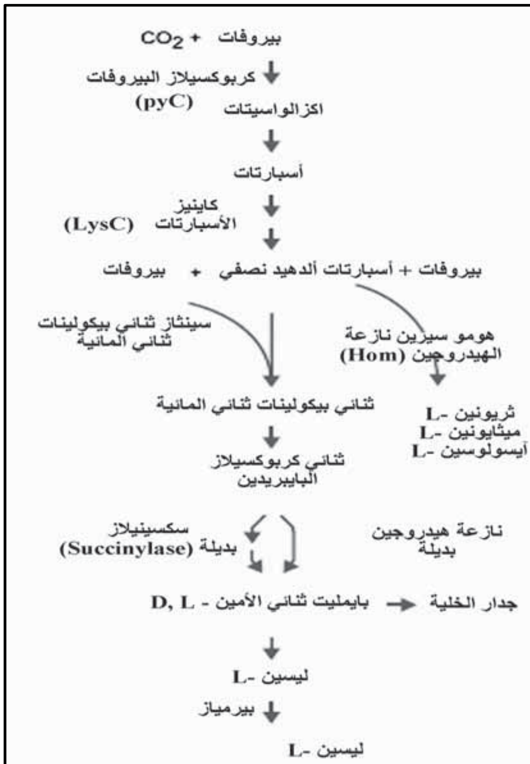
الشكل 10.14 مصنع Hakko Kyowa لإنتاج حمض أميني في اليابان تظهر 7 مخمرات كبيرة على اليمين كل واحدة بحجم $240\ m^3$، وهي مناسبة لإنتاج L-gulamate.

5.14 L – لايسين L-Lysine

1.5.14 الكيمياء الحياتية Biochemistry

الحمض الأميني الثاني الذي ينتج فقط باستخدام بكتريا *C.glutamicum* هو L–لايسين. إن ذرات الكربون في اللايسين تشتق من البيروفات (Pyrurate) والاوكزالواسيتات (Oxaloacetate) أثناء عملية الأيض المركزية (الشكل 11.14). وعلى نقيض الحالة الخاصة للـــ L – غلوتامات، حيث إن خطوة واحدة فقط تمثل عملياً المسار التخليقي، فإن L – لايسين يُخَلَّق عن طريق مسار طويل. علاوة على ذلك، فإن الخطوتين الأوليتين في تخليق اللايسين تكونان مشتركتين مع الأنواع الأخرى من الأحماض الأمينية العائدة إلى عائلة أسبارتات (Aspartate) وهي L – ثريونين و L – ميثايونين و L – أيسولوسين.

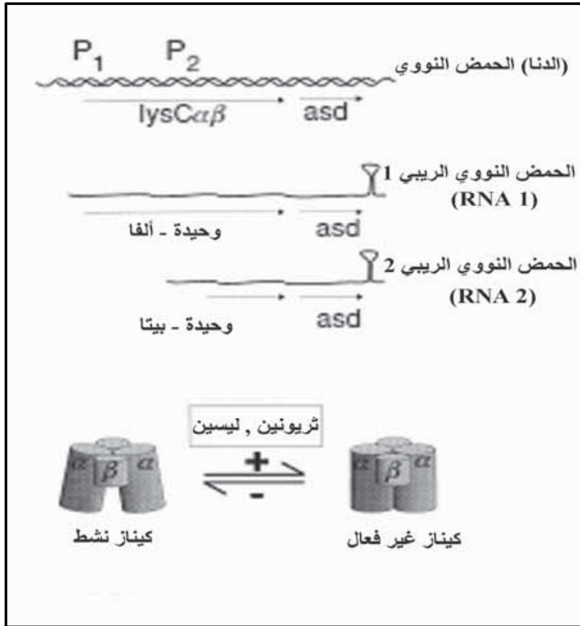
أنزيم الكاينيز (Kinase) الذي يبدأ عملية تخليق اللايسين يُمنع رجعياً (Feedback-inhibited) من قبل اللايسين بواسطة اللايزين والثريونين مجتمعين.



الشكل 11.14 توليف L – ليسين في C.glutamicum مع تفاعل (Carboxylation) لتجهيز الــ Oxaloacetate معروض أيضاً هو الدور المركزي لتوزيع الأسبارتات نصفي الألدهيد (Aspartate semi aldehyde) والارتباط إلى توليف جدار خلايا.

يحفز التفاعل الأول الذي يبدأ عملية تخليق L – لايسين بواسطة أنزيم اسبارتات كيناز (Aspartate kinase) ، وكما هو الحال مع أي أنزيم فعّال في بداية مسار تخليقي طويل، فإن فعاليته تكون تحت السيطرة الشديدة. يكون هذا لأنزيم غير فعّال في حالة وجود L – لايسين و L – ثريونين معاً وبوفرة، حيث إنهما في هذه الحالة يعطيان إشارة رجعية (انظر الفصل الثاني) تخص وفرة هاتين المادتين الايضيتين الرئيسيتين التابعتين إلى عائلة Aspartate للأحماض الأمينية. ولأنزيم الكاينيز تركيب مثير (الشكل 12.14)، فهو يتألف من وحدتين ثانويتين من نوع α (Two α Sub - units) تتكون كل منهما من 421 حمضاً أمينياً، ووحدتين ثانويتين من نوع β يتألف كل منهما من 171 حمضاً أمينياً. ولقد وجد أن تتابع الأحماض الأمينية للوحدة الثانوية β يكون مماثلاً لتتابع الأحماض الأمينية الموجودة في الطرف الذي يحمل مجموعة الكربوكسيل للوحدة الثانوية α. إن الأساس الجزيئي لهذه الحالة هو أن الجين (LysCβ) للوحدة الثانوية الأصغر β،

هو جزء من تركيبة وحدة α الثانوية الأكبر. وبهذا يتوافر حافزات (Promoters) في هذا الموقع الجيني: أحدهما يحفز تعبير الجين LysCα والجين الأخر المسى asd الذي يقع أسفل مجرى الجين الأول. أما الحفاز الثاني فإنه يخفز تعبير الجينين Lysc β وasd. لذلك، تكمن خصائص تنظيم أنزيم Kinase في الوحدة الثانوية β. وهذا يغير في تركيب الوحدة الثانوية β بشكل خاص، أو تغيير التركيب في الطرف الكربوكسيلي لتلك الوحدتين معاً، ويؤدي إلى تكوين أنزيم كاينيز Kinase دائم الفعالية لا يمكن تثبيطه. إن بكتريا *C.glutamicum* المحتوية على مثل هذا الأنزيم غير الحساس تفرز بعضاً من L – لايسين، مما يشير إلى وجود نوع بسيط من السيطرة الدفقية في هذا الكائن المجهري.



الشكل 12.14 أوبيرون IysCasd من البكتيريا *C. glutamicum* والسيطرة التفارغية على (allosteric control). الحفاز الثاني ضمن lysC ينتج تشكيل الوحدة الفرعية β المكونة للوحدة الفرعية التنظيمية لبروتين Kinase ببنية β_2 α_2

أنزيم السنثيز (Synthase) يحدد الدفق The synthase limits flux

خطوة مهمة أخرى في سيطرة الدفق أثناء التخليق الحيوي للإيسين هي مستوى توزيع مادة أسبارتات نصفية الألدهيد (Aspartate semialdehyde). تتنافس فعالية أنزيم Dihydrodipicolinate synthase مع أنزيم Homoserine

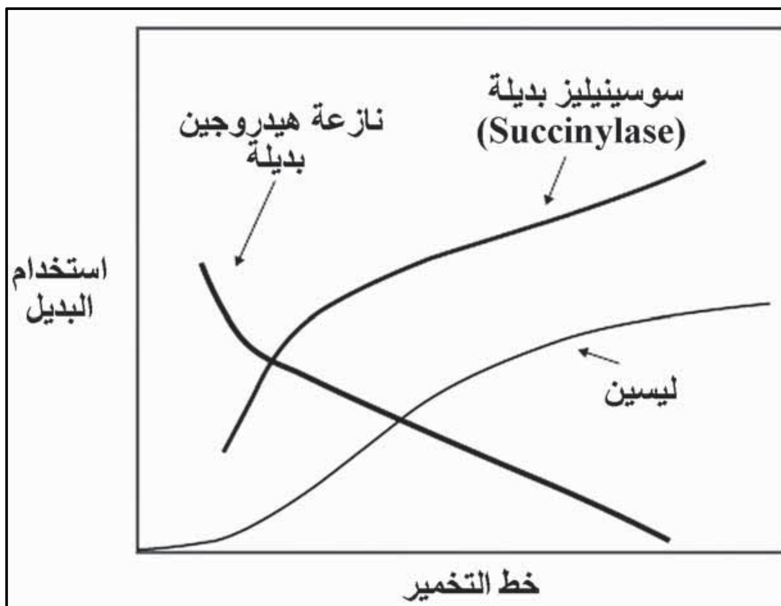
dehydrogenase على مادة Aspartate semialdehyde (الشكل 11.4). وقد أظهر قياس التعبير الزائد (Overexpression) المتدرج لجين السنثيز (dap A) مع قياس فعالية الأنزيم وجود زيادة في الدفق المتدرج نحو L – لايسين (مقرونة مع بزيادة فعالية أنزيم السينيثز). وبهذا، فأن أنزيم السنثيز يعمل كحاجز للسيطرة دفق مادة Aspartate semialdeyhde نحو L – لايسين. ويمكن تجاوز هذا الحاجز في حالة ازدياد تركيز مادة Aspartate semialdehyde التي يمكن تحقيقها بسهولة من خلال تقليل الدفق نحو الأحماض الأمينية المشتقة من الهوموسيرين (Homoserine). ويمكن الوصول إلى هذه الحالة عن طريق استخدام أنزيمات Homoserine dehydrogenase المطفرة التي لها فعالية تحفيز ضعيفة جداً.

انقسام عملية تخليق اللايسين لضمان تكوين صحيح لجدار الخلية

من صفات بكتريا *C.glutamicum* المتميزة احتواؤها على مسار منقسم أو منشطر (Split pathway) لتخليق L – لايسين. فعلى مستوى مادة Piperidenie-2.6-dicarboxylate، يكون الدفق ممكناً، أمّا من خلال أنزيم Succinylase المشتق من تخليق D,L-Diaminopimelate أو من خلال مشتق الأنزيم Dehydrogenase (الشكل 11.4). وعلى العكس من ذلك، فإن بكتريا *E.coli*، على سبيل المثال، تحتوي على مشتق أنزيم Succinylase فقط، في حين تحتوي بكتريا *Bacillus Macerans* على أنزيم Dehydrogenase فقط.

إن توزيع الدفق عن طريق كلا المسارين قد تم تقديره خلال دراسة باستخدام المرنان المغنطيسي الذري (NMR) واستخدام الجلوكوز المشع $[1\text{-}C^{13}]$ Glucose كمادة أولية. وقد وجد أن توزيع الدفق كان مختلفاً (الشكل 13.14). في حين لوحظ في بداية الزرع أن ثلاثة أرباع L – لايسين تقريباً يصنع بواسطة مشتق أنزيم Dehydrogenase، في حين أن L–لايسين الجديد يُخلّق بكامله عن طريق الأنزيم Succinylase. وهناك سبب ميكانيكي وراء ذلك كما أوضحته التوصيفات الحركية، إن أنزيم Dehydrogenase يتصف بألفة ضعيفة نحو مادته الأولية (الأمونيوم) حيث تبلغ قيمتها k_m=28 ملي مول. وبهذا فعند التراكيز المنخفضة من الأمونيوم، وكما هو

الحال في نهاية عملية التخمير، فإن هذا الأنزيم لا يستطيع المساهمة في تصنيع L-لايسين. وبدلاً من ذلك، فإن الدفق عن طريق مشتق أنزيم Succinylase يكون هو المفضل. إذ إنه بعد إضافة مجموعة Succinyl إلى Piperidenine-2.6-dicarboxylate يعمل أنزيم Transaminase على إضافة مجموعة أمينية ثانية إلى الجزئية النهاية للـــ L-لايسين.



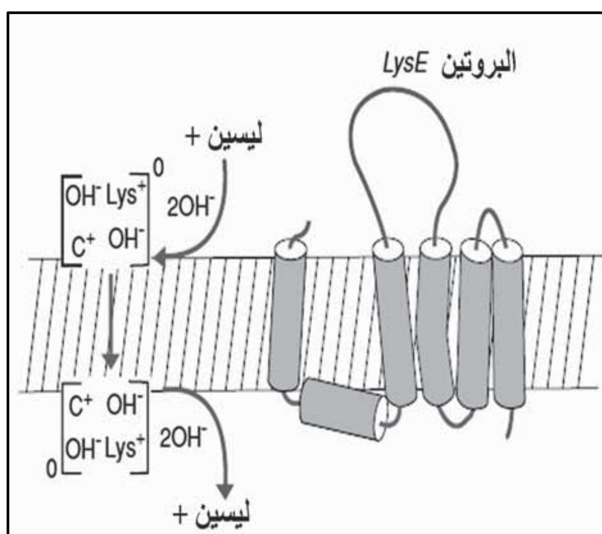
الشكل 13.14 في بداية تخمير L- لايسين استخدام مشتق الديهيدروجيناز يسود على مشتق السكسينيلاز، بينما في النهاية يتم استخدام مشتق السكسينيلاز على وجه الحصر تقريباً. استخدام المشتق يتراوح من 0 إلى 100%.

في حالة تثبيط أي من الأنزيمين (Succinylase أو Dehydrogenase) فإن إنتاج L-لايسين سينخفض بنسبة 40%. بهذا، فإن الأنزيمين معاً يضمنان دفق عالٍ نحو L-لايسين أثناء عملية التخمير. إن الوظيفة الطبيعية لهذا المسار المنشطر هي توفير تجهيز كافٍ من المادة الوسيطة (قبل الأخيرة) لعملية تخليق L – لايسين. وهذه المادة هي D,L Diaminopimelate التي تعتبر وحدة ربط مهمة جداً في طبقة الببتيدوغلايكان (Peptidoglycan) في جدار الخلية. إن المسار المنشطر في بكتريا *C.glutamicum* هو مثال لمبدأ مهم في فسلجة

الأحياء المجهرية: ومشتقات المسار، عموماً، لا تكون فائضة عن الحاجة، ولكنها تنشأ لتوفير مواد أيضية رئيسية تحت ظروف بيئية مختلفة.

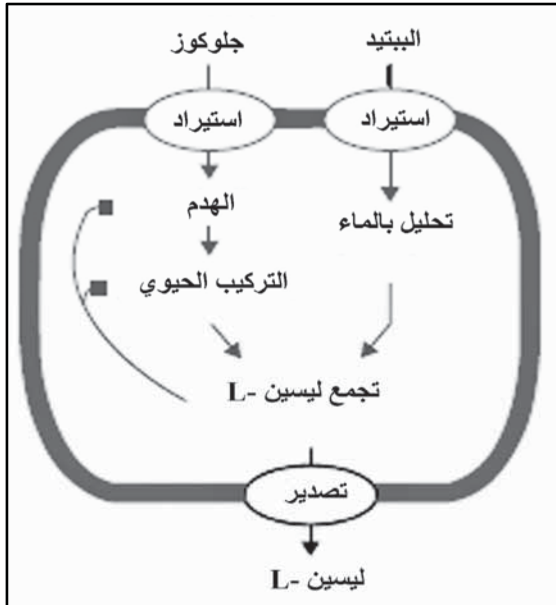
تصدير L–لايسين Export of L- Lysine

لم تكن الأسس الجزيئية لتصدير الأحماض الأمينية في البكتريا معروفة لغاية عام 1996، وذلك لأن عملية التصدير الخاص لم تكن حينذاك مهمة. ثم تمّ التوصل إلى إنجاز علمي من خلال كلونة جين ناقل لتصدير L–لايسين من بكتريا *C.glutamicum* الذي أدى إلى حدوث اكتشافات مذهلة تتعلق بطبيعة وأهمية مثل هذا النوع الجديد من أجهزة التصدير (Exporters). إن ناقل L–لايسين (LysE) عبارة عن بروتين غشائي صغير كتلته 25.4 دالتون، ويحتوي على امتداد حلزوني عبر الغشاء على شاكلة ما هو موجود في النواقل، وربما يكون فعالاً عندما يكون بحالة ثنائيةً (Dimer) (الشكل 4.14). وهنالك عدة خطوات منفصلة تشترك في آلية النقل. هذه الخطوات هي: (1) تحميل الناقل ذي الشحنة السالبة بمادته الأولية L–لايسين مع أيونين إثنين للهيدروكسيل، (2) نقل المادة الأساس خلال الغشاء، (3) تحرير L–لايسين والأيونات المرافقة له خارج الغشاء، وأخيراً، (4) إعادة توجيه (Reorientation) الناقل. إن مصدر القوة الدافعة لعملية الانتقال بالكامل هي الطاقة الكامنة في الغشاء.



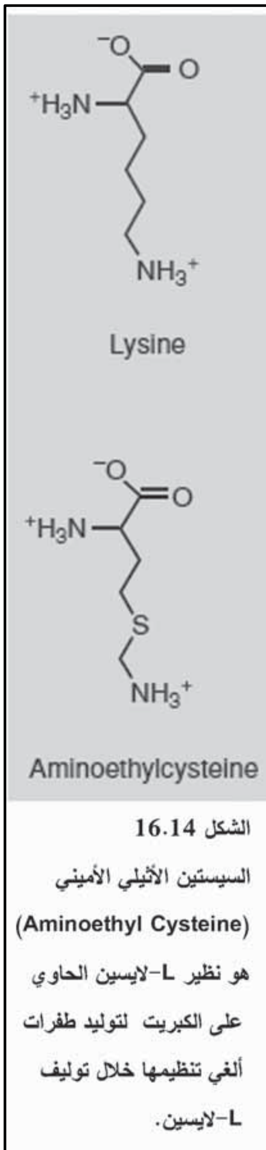
الشكل 14.14 طوبولوجيا مُصَدِّر L – لايسين (L- lysine exporter) يظهر لوالبه الخمسة الممتدة في الغشاء والجزء الإضافي الكاره للماء، ويبين الشكل أيضاً الخطوات المتميزة رسمياً لعملية الإزفاء (translocation) التي تسوقها إمكانية الغشاء الكهربائية الكافية.

إن الوصول إلى الجين المسؤول عن تصدير اللايسين مكّن كذلك من حلّ لغز سبب احتواء بكتريا *C.glutamicum* على مثل هذا المُصَدِّر. ففي الطافر الخالي من جين LysE المُزود بـــ الجلوكوز (Glucose) مع ملى مول واحد من الببتيدات الثانية، Lysyl-alanine، يتجمع تركيزاً كبيراً جداً من L−لايسين يبلغ أكثر من 1 مولار داخل الخلية مما يؤدي إلى إيقاف نمو الطافر (الشكل 15.14). وبهذا فإن المُصَدِّر(Exporter) يعمل كصمّام لإفراز أي كميات زائدة من L−لايسين داخل الخالية التي قد تحصل في البيئة الطبيعية عند وجود الببتيدات. وكما في حالة الأنواع الأخرى من البكتريا فإن *C.glutamicum* تحتوي على نظام فعّال لأخذ الببتيدات، وكذلك على أنزيمات التحليل المائي (Hydrolysing enzymes)، وبالتالي تسمح بالوصول إلى الأحماض الأمينية التي تعتبر وحدات بناء قيّمة. علماً بأن بكتريا *C.glutamicum* ليس لها القابلية على تكسير هذه المادة ولهذا يجب منع أي تراكم لمادة اللايسين. وكما أوضح مشروع الجينوم، هناك بالتأكيد نواقل شبيهة عديدة تتواجد في الأنواع المختلفة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام. ولهذا فمن المتوقع وجود هذا النوع من السيطرة على الحمض الأميني داخل الخلية بواسطة المُصَدِّر في الأنواع الأخرى من البكتريا، أيضاً.



الشكل 15.14 مُصَدِّرا الأحماض الأمينية يعملون بمثابة صمّام للإفراج عن حمض أميني فائض موجود، كذلك هو الأمر في حال المنتجين الآخرين، أو في الحالة الطبيعية خلال النمو على الببتيدات.

2.5.14 سلالات الإنتاج **Production strains**



الشكل 16.14
السيستين الأثيلي الأميني (Aminoethyl Cysteine) هو نظير L-لايسين الحاوي على الكبريت لتوليد طفرات ألغي تنظيمها خلال توليف L-لايسين.

اشتقت السلالات المنتجة لـــ L-لايسين على مدى عقود بواسطة التطفير للحصول على سلالات لها القدرة على إفراز أكثر من 170 غم/لتر من L-لايسين. من الواضح أن هذه السلالات قد تكون حاملة لمجموعة كبيرة من الصفات المظهرية لتحقيق توجيه هذا الدفق الهائل (الجدول 2.14). نموذجياً، تكون هذه السلالات مقاومة لبعض مشابهات اللايسين أو Diaminopimelate. إن إحدى الصفات النموذجية لمنتجات L-لايسين هي مقاومتها لمشابه اللايسين، S (2-aminoethyle)-L-cysteine (الشكل 16.14). ويكون الجين المسؤول عن Aspartate kinase طافراً في هذه السلالة بحيث لا يمكن كبحها بواسطة L-لايسين. ولقد استخدمت دزينات من المواد الكيميائية الأخرى، التي لها تركيبة مشابهة للـــ L-لايسين، مثل γ-methyle-L-Lysine أو α-chlorocaprolactam في عمليات الغربلة لغرض الحصول على سلالات منتجة أفضل. إلا أنه خلال هذه المرحلة من تطوير السلالة غالباً ما تكون علاقة الصفات المظهرية بالإنتاج العالي والأسس الجزيئية لذلك غير معروفة. كذلك، ومع التقدم الحاصل في تحديد تتابع الجينوم أصبح ممكناً تحديد تتابعات الجينوم للسلالات المنتجة التقليدية، وأمكن استعمال الطفرات التي يكشف عنها بهذه الطريقة لاختبار أهميتها في اشتقاق سلالات منتجة جديدة (انظر الشكل 6.14). وباستخدام الطريقة المعتمدة على الجينوم هذه استحدثت ثلاث طفرات نقطية (Point Mutations) في جينوم النوع البري

لاشتقاق سلالة ممتازة في إنتاج L-لايسين. كما أمكن، ومن خلال إدخال أليلات (Alleles) الجينات المشفرة لأنزيمات Aspartate kinase (lysC-Thr 311lle) و Pyruvate Carboxylase (pyc-Pro 458 Ser) و Homoserine dehydrogenase (hom-val59 Ala)، إنتاج 80 غم/لتر من اللايسين وبمعدل إنتاجية قدره 3.0 غم/لتر/ساعة.

3.5.14 عملية الإنتاج Production process

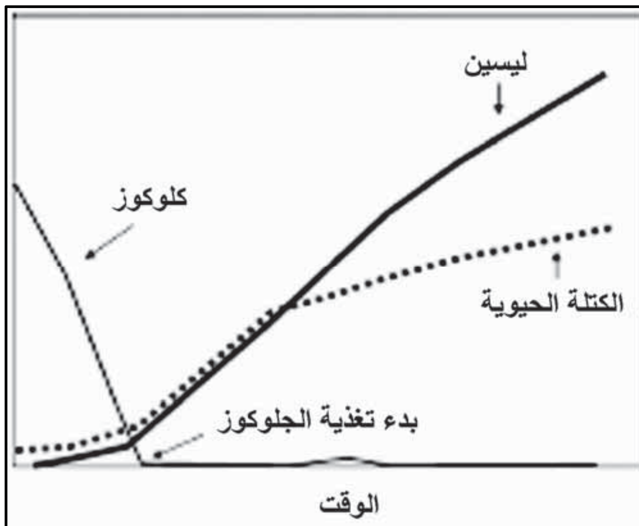
إن أكثر مصادر الكربون شيوعاً للاستخدام في إنتاج L-لايسين وغيره من الأحماض الأمينية هو المولاس أو الدبس[1] (ولا سيما مولاس قصب السكر، أو الشمندر، أو البنجر)، أو المولاس ذو المذاق العالي (High test molasses) (مولاس قصب السكر المنقلب – Inverted eane molasses)، أو السكروز ومتحلل النشا. على عكس بكتريا *E.coli* فإن النوع البري من بكتريا *C.glutamicum* يمكنه استهلاك كلٍّ من الجلوكوز والسكروز. كان المولاس غالباً ما يستعمل، في الماضي، في عملية الإنتاج، وذلك لأنه مصدر كربوني رخيص نسبياً. علماً، أن استخدام المولاس له مساوىء متعددة، منها:

- تصدير الفضلات من شركات السكر إلى مصنع التخمير بسبب تكاليف إضافية.
- إن توفر المولاس في فصول معينة فقط يؤدي إلى تدهور نوعيته خلال فترة خزنه.

ولهذا، فإن هناك توجهاً نحو الابتعاد عن استعمال المولاس والاتجاه نحو استعمال مصادر كربون مكررة مثل متحللات النشا. أما مصادر النتروجين المربحة فهي سلفات الأمونيوم والأمونيا (غاز أو ماء الأمونيا). أما بالنسبة إلى عوامل النمو المطلوبة فيتم توفيرها من متحللات البروتين النباتية (Plant protein hydrolysate) أو من سائل نقيع الذرة، أو من خلال إضافة مركبات أخرى محددة. يوضح الشكل (17.14) عملية تخمير لايسين نموذجية. فبعد

[1] المولاس (الدبس) molasses: عصير سكري مركز يستخرج من الشمندر السكري أو البلح.

استهلاك السكر الأولي، يتم إضافة المواد الأولية باستمرار حيث يتراكم اللايسين إلى حد 170 غم/لتر. وتوفر سلفات الأمونيوم الأيون المعاكس لأجل معادلة تراكم الأحماض الأمينية القاعدية. ولهذا فإن L–لايسين الموجود في مرق التخمير يكون على شكل كبريتات. لقد اتفق على وصف اللايسين في الأدبيات العلمية بـــ Lysine. HCI. بسبب الكلفة العالية للسكر، فإن محصول التحويل (Conversion yield) يُعدّ مقياساً مهماً جداً لعملية الإنتاج بأكملها.



الشكل 17.14 برنامج زمني لتراكم L– لايسين في عملية الإنتاج. هناك ثلاث مراحل لنمو وتراكم L– لايسين

نُشِرت نتائج تشير إلى الحصول على 45–50 غم من اللايسين لكل 100 غم من المصدر الكربوني. ولأجل استرجاع L– لايسين من مرق التخمير طورت عدة طرق، تستعمل منها الآن ثلاث طرق لتجهيز اللايسين بالشكل المناسب لاستخدامه في الأعلاف، وأشكال التجهيز هي:

- مستحضر بلوري يحتوي على 98.5 % من L-lysine.HCI. يمكن الحصول عليه بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، أو التبخر، أو البلورة. كما أن طريقة التجفيف بالرش المباشر لمستخلص المبادل الأيوني ممكنة كذلك.

• محلول قاعدي لمُركّز L- لايسين يحتوي على 50.7 % L-لايسين. يتم الحصول عليه بواسطة فصل الكتلة الحيوية، أو التبخر أو الترشيح.

• تحضيرات على شكل كبريتات اللايسين الحبيبية (Granulated lysine sulphate) تحتوي على 50 % L- لايسين. يتكون هذا المستحضر من كامل مرق التخمير بعد تهيئته بواسطة التجفيف بالرش وتحويله إلى حبيبات.

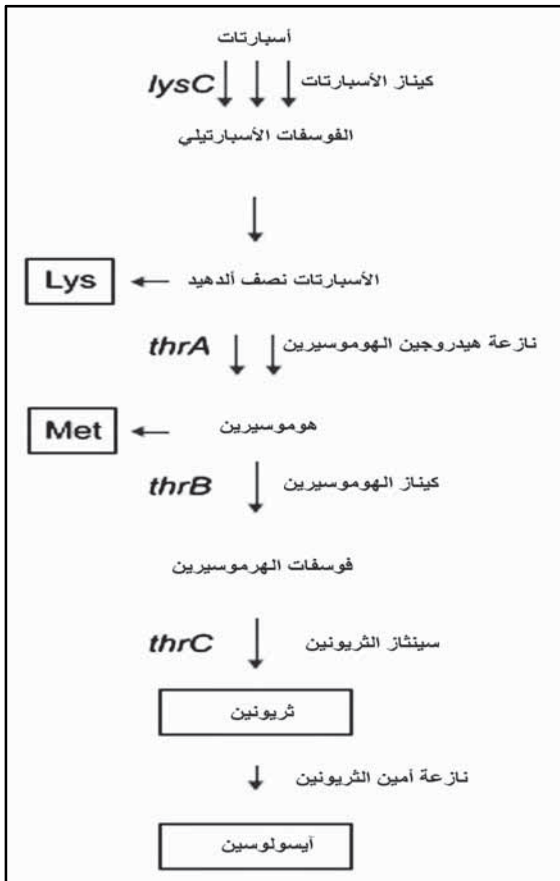
تختلف طرق إنتاج هذه الأشكال كثيراً في كلفة الاستثمار وفي الفقدان خلال معالجات أسفل المجرى، وفي حجم الفضلات وملاءمتها للمستخدم. كذلك، إن جميع هذه العوامل، إضافة إلى عملية التخمير نفسها هي التي تقرر نجاح المتنافسين المختلفين في إنتاج L-لايسين.

6.14 L- ثريونين L-Threonine

1.6.14 الكيمياء الحيوية Biochemistry

يتم الإنتاج التجاري لــ L- ثريونين باستخدام طوافر من بكتريا *E.coli*. يُخلّق L- ثريونين من خلال مسار قصير يتكون من خمس خطوات فقط (الشكل 18.14). وكما ذكر سابقاً فإن الخطوات الأولى تكون مشتركة مع خطوات تخليق L – لايسين و L – ميثايونين. علاوة على ذلك، فإن L – ثريونين يمثل كذلك مادة وسطية في عملية تخليق L – أيسولوسين (L-Isolucine) ويتطلب هذا طبعاً تنظيماً أيضياً خاصاً. لقد تم حل هذه المشكلة بالنسبة إلى بتكريا *C.glutamicum* بطريقة، بحيث يتم تثبيط أنزيم Aspartate kinase الوحيد من خلال تواجد L – لايسين و L – ميثايونين معاً. أما في حالة *E.coli* فهناك 3 أنزيمات متشابهة (Isoenzymes) موجودة، وكل منها يثبط بمنتوج نهائي مختلف: واحد بواسطة **الثريونين**، والآخر بواسطة L- لايسين، والثالث بواسطة L – ميثايونين. علاوة على ذلك هناك فعاليتان أنزيميتان لهوموسرين ديهيدروجيناز (Homoserine dehydrogenase): تكبح الأولى بواسطة L – ثريونين، وتثبط الثانية بواسطة L- ميثايونين. إضافة إلى ذلك، فإن الجينات المسؤولة عن هذه الفعاليات تتجمع

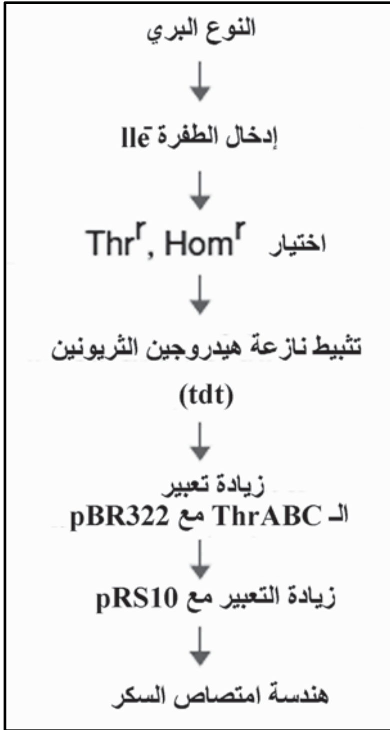
على شكل وحدات استنساخ (أوبيرون) Transcriptional unit، تضمن التخليق المتوازن للحمض الأميني المناسب عند مستوى تعبير الجين. إن الأوبيرون المسؤول عن تخليق L–ثريونين في بكتريا *E.coli*. هو ThrABC الذي يشفر إلى ثلاثة ببتيدات متعددة. ويشفر الجين Thr A إلى ببتيد متعدد مندمج يتكون من أنزيم Aspartate kinase مع أنزيم Dehydrogenase homoserine. وهنالك سيطرة قوية على التعبير الجيني في هذا الأوبيرون تتم بواسطة آلية تضعيف الاستنساخ (Transcription attenuation). وإن الببتيد المقابل القائد الموجود في بداية وحدة الاستنساخ هو -Thr-Thr-llr- Thr-Thr- Thr-lle-Thr-lle Thr-Thr الذي يعمل على تحسس وفرة L– ثريونين و L– أيسولوسين. فعندما تكون RNA الناقلة (tRNA) المقابلة منزوعة الشحنة، فإن الببتيد القائد سوف لا يتكون، ويزداد معدل استنساخ (كلونة) الأوبيرون عشرة أضعاف في الأقل.



الشكل 18.14 المسار القصير لتوليف L–ثريونين مرتبط مع L– لايسين، و L– ميثيونين و L– آيسولوسين. تمتلك *E.coli* أنزيمات متشابهة (isoenzymes)، كما يتضح من الأسهم المتوازية، كل واحد منها ينظم بشكل منفصل من قبل أي تعبير أو تثبيط جيني يتعلق بالأحماض الأمينية الفردية لهذا المسار.

2.6.14 السلالات المنتجة Producer strains

اعتماداً على تركيب هذا المسار الأيضي وطريقة تنظيمه فإن هناك تركيزاً واضحاً على هدفين رئيسيين لتصميم السلالة المنتجة: منع تكوين L–أيسولوسين وتعبير عالٍ ومستقر للأوبيرون Thr ABC. ولهذا فإن من أولى خطوات تطوير السلالة هي إحداث طفرات كروموسومية لإنتاج سلالة راشحة (leaky) للأيسولوسين[2] (الشكل 19.14). إن طفرة الأيسولوسين الواقعة في أنزيم Threonone deaminase هي طفرة خاصة جداً ومهمة. وهنالك حاجة إلى L–أيسولوسين فقط في حالة وجود تراكيز ضعيفة لــ L– ثريونين، ولكن عند وجود تركيز عالٍ من L– ثريونين فإن النمو في هذه الحالة لا يعتمد على إضافة L–أيسولوسين. وهذا هو الحال مع أنزيم Threonine deaminase المطفر لكي يصبح ذا ألفة ضعيفة. إن لهذه الطفرة عدة ميزات جيدة. فهي أولاً، تمنع التكوين الزائد للمنتوج العرضي غير المرغوب به من L–أيسولوسين. كما أنها تمنع عملية الإيقاف غير الناضج لأوبيرون Thr ABC بسبب محدودية وجود tRNA Ile.



الشكل 19.14 الخطوات ذات الصلة في تطوير سلالة *E.coli* المناسبة لإنتاج L–ثريونين تنطوي على تطفير غير موجه، وتعطيل الجينات واستخدام بلازميدات مختلفة

---

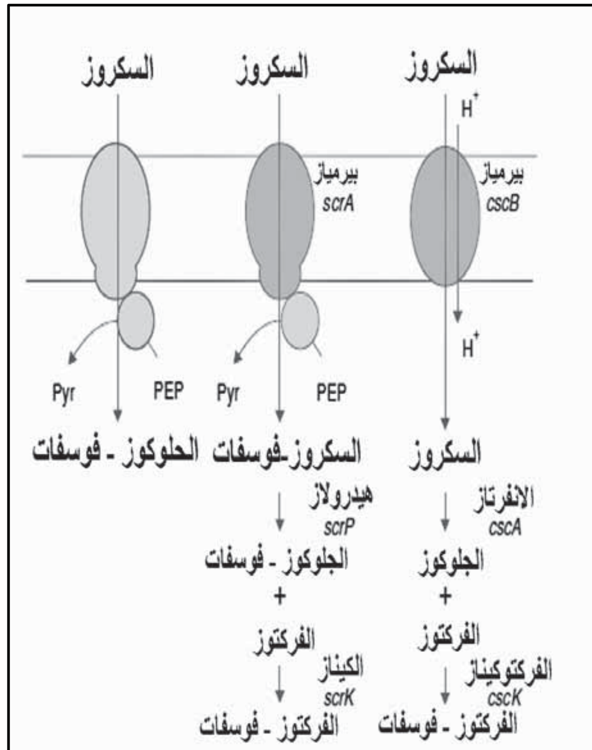
[2] السلالة الراشحة للأيسولوسين: هي السلالة المنتجة لكميات قليلة جداً من الأيسولوسين (المترجم).

النتيجة الثالثة لطفرة أيسولوسين أكثر غموضاً. إن لها علاقة بالسلالة المنتجة الحاوية على بلازميد في مختلفة خطوات الزرع الأولى، بدءاً باستخدام مستنسخ (Clone) مفرد في تلقيح مزرعة أولية لكل عملية إنتاج، ومن ثم زيادة حجم المزرعة من خلال عدة مراحل. يعني هذا أن السلالة المستنسخة قد تم تخميرها بحوالى 25 جيل ممّا يعني وجود خطر حقيقي في فقدان البلازميد الحامل لأوبيرون Thr ABX. سيكون هذا، طبعاً، بمثابة كارثة إذا حصل أثناء مرحلة الإنتاج الأخيرة. علماً، أنه بوجود طفرة أيسولوسين راشحة فإن الخلايا الفاقدة للبلازميد ستصبح في موقف صعب، وذلك لأنها غير قادرة على تخليق تركيز عالٍ من L–ثريونين. وبالتالي فستتوقف عن النمو، وهكذا فإن خلايا المزرعة المستقرة ستكون جميعها تقريباً حاملة للبلازميد. ومن العمليات اللاحقة في تطوير هندسة السلالة إدخال صفات المقاومة للــ L– ثريونين و L– هوموسيرين التي وجد أنها تزيد من تعبير البروتين الناقل المُصَدِّر للــ L–ثريونين من الخلية إلى الوسط الزرعي. وبالتالي يتم إيقاف فعالية الجين tdh، الذي يشفر لأنزيم Threonime dehydrogenase، ممّا يمنع تكسير الثريونين. للحصول على فعالية عالية للأنزيمات التي يشفر لها الأوبيرون Thr ABC، فقد تم استنساخ (كلونة) الأوبيرون من سلالة تتصف باحتوائها على أنزيمي Aspartate kinase و Homoserine dehydrogenase المقاومين للتثبيط بــ L – ثريونين. إضافة إلى ذلك فقد تم حذف مضعف الاستنساخ. ولقد أدخل الأوبيرون المهندس بهذه الطريقة في البلازميد الناقل PBR322 واستخدم بنجاح في عمليات التخمير، إلا أن تحسينات لاحقة أحدثت عن طريق استبدال البلازميد pBR322 ببلازميد منحدر من البلازميد pRS1010 أدت إلى إنتاج مستوى أعلى من التعبير والاستقرار.

أخذ المادة الأولية Substrate uptake

بما أن سعر السكر له تأثير كبير في سعر الحمض الأميني المنتج، فمن الضروري أن تكون هناك إمكانية لاستبدال الجلوكوز بالسكروز كمادة أولية. علماً، أن هنالك سلالات من *E.coli* K-12 لا يمكنها استخدام السكروز، وكذا الحالة مع السلالات الأصلية المنتجة للــ L–ثريونين. ولحسن الحظ وجد نظامان آخران

لاستهلاك السكروز موجودان في سلالات أخرى مما مَكّن من هندسة عملية استهلاك السكر (الشكل 20.14). إن أحد هذين النظامين مُمثل بالجين المنظم SCR الموجود في سلالة *E.coli* HI55، حيث إن الناقل الحقيقي يتكّون من نظام Phosphoenolpyruvate: Sugar Phospho-Transferase (PTS). إن إدغام جينات Scr إلى السلالة K-12 يؤدي إلى أخذ السكروز وفسفرته. وبسبب النشاطات اللاحقة لأنزيمي Hydrolase و Fructokinase تمّ توجيه السكر إلى عملية الأيض المركزية. هذا وهنالك نظام بديل لاستهلاك السكر يوفره الجين المنظم CSC الموجود في بعض سلالات *E.coli*. يتم، في هذه الحالة، نقل السكروز بواسطة ناقل يُشفر له بواسطة الجين CSCB بالتعاون مع البروتونات. وباستخدام تقنية الجينات القفازة (Transposition) أدخلت قابلية الجين CSCB على استهلاك السكروز في سلالة قابلة على استهلاك الجلوكوز. ومع أن السلالة الناتجة



الشكل 20.14 آليات امتصاص السكر والفسفرة في *E.coli* يقترن الإزفاء (translocation) بواسطة الفسفرة، كما هو الحال بالنسبة إلى نظام الأنزيم Phosphotransferase (اليسار والوسط)، أو يحدث في تزامنٍ مع البروتونات بدون الفسفرة (يمين). يشترك الأنزيم الناقل للسكروز Phosphotransferase (وسط) مع واحد من مجالات نقل الفسفوريل (phosphoryl) مع مكون من الأنزيم (Phosphotransferase glucose) translocating. Pyr = بيروفات، PEP = Phosphoenolpyruvate.

كانت غير قادرة أصلاً على أخذ السكروز، إلا أنها أصبحت الآن قادرة على إدخال السكروز بمعدل 9 بيكامول/دقيقة ($pmol\ min^{-1}$). وباستخدام بلازميد حامل للجين المنظم ازداد هذا المعدل إلى 43 بيكامول/دقيقة، وكان مماثلاً للمعدل الموجود في السلالة التي تم عزل جين CSCB منها.

3.6.14 عملية الإنتاج Production process

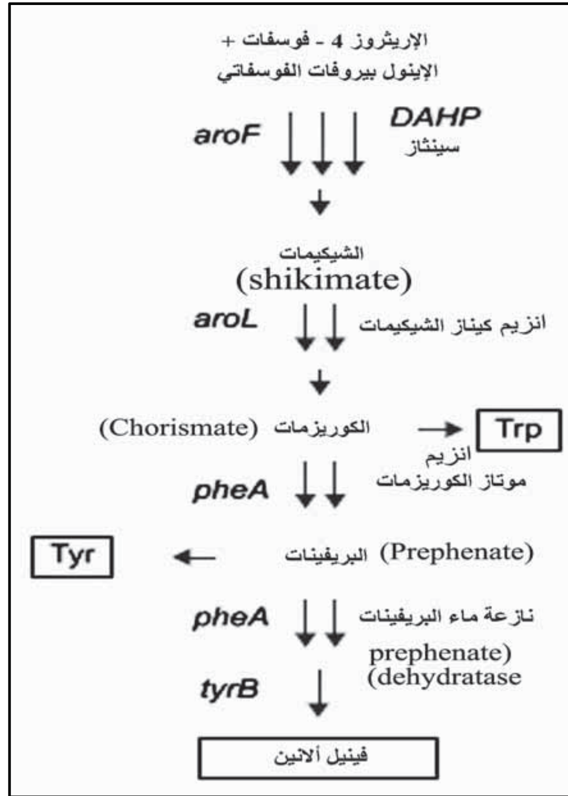
تحدث عملية تخمير السلالة المهندسة المنتجة لــ L- ثريونين في وسط من أملاح معدنية بسيط يحتوي إما على الجلوكوز أو السكروز كمادة أولية، مع إضافة كمية قليلة من مكونات وسط معقد مثل مستخلص الخميرة. بعد عملية التلقيح (Inoculation) واستهلاك السكر المجهز أولياً، تبدأ عملية التغذية بالسكر. إضافة إلى ذلك يجب إضافة الأمونيا على شكل غاز أو بشكل هيدروكسيدالأمونيوم (NH4 OH) التي تنظم عن طريق السيطرة على الرقم الهيدروجيني. وبهذا فإن إستراتيجية التغذية في حالة تخمير L- ثريونين تعتبر سهلة جداً مقارنةً بتخمير L-لايسين، حيث يتطلب تراكم الناتج القاعدي إضافة إلى الكبريتات كمصدر للأيون المعاكس.

بعد مرور 77 ساعة على التخمير سيتواجد L- ثريونين بكثافة 100 غم/لتر تقريباً مع محصول تحول يصل إلى حد 66%. تتصف عملية التخمير بمستوى منخفض في تكوين الناتج العرضي ذي الفائدة في معالجات أسفل المجرى. كما إن بلورة L-ثريونين عملية سهلة بسبب انخفاض قابليته على الذوبان وبسبب انخفاض كثافة الملح الموجود. في عملية كهذه يتم بداية تكويس الخلايا (Coaggulation) إما بواسطة الحرارة أو بواسطة الرقم الهيدروجيني ويتبعها عملية ترشيح. بعد ذلك يركز المرق، ومن ثم تبدأ عملية البلورة بواسطة التبريد. إن فصل وتجفيف البلورات ينتج منه محصول يراوح بين 80-90%، ويكون فيه L- ثريونين بدرجة نقاوة يزيد على 90%. هذا وقد تكون هناك حاجة إلى خطوة إعادة البلوّرة للحصول على L- ثريونين عالي النقاوة.

L 7.14–فينايل ألانين L-Phenylalanine

1.7.14 الكيمياء الحيوية Biochemistry

يمكن إنتاج L– فينايل آلانين بواسطة البكتريا *E.coli* و *C.glutamicum* وتشترك عملية تخليق L– فينايل الآنين بقسم منها مع عملية تخليق L– تايروسين و L– تريبتوفان. إن هذه الأحماض الأمينية الأروماتيه الثلاثة لديها ما هو مشترك وهو تكثيف الأريتروز – 4 – فوسفات والفوسفوانيل بيروفات إلى (DAHP) 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7 phosphate، مع تحول إضافي في ست خطوات أخرى إلى حدّ الوصول إلى الكورزمات (Chorismate). بعدها يصنع L–فينايل الآنين بثلاث خطوات إضافية (الشكل 21.14). توجد ثلاثة أنواع من أنزيم DAHP Synthase في بكتريا *E.coli* ويشفر لها بالجينات Arof و aroG و aroH. وتلعب هذه الأنزيمات دوراً رئيسياً في السيطرة على الدفق (Flux). إن دور هذه الأنزيمات المنظم لفعالية التحفيز، في كل حالة، بواسطة واحد من الأحماض الأمينية العطرية وهذا يذكرنا بدور أنزيم (Aspartate kinase) التنظيمي في تخليق الثريونين. إن حوالى 80% من الفعالية الكلية للـــ -DAHP



الشكل 21.14 مسار مبسط لتوليف L–فينيل الآنين يشمل عشر خطوات تفاعل فردية محفزة بأنزيم. بالإضافة إلى ذلك، تعمل isoenzymes في E.coli كما تدل عليها الأسهم المتوازية. أما الأنزيمات الرئيسية والجينات الرئيسية مختارة فهي معطاة.

synthase تعود إلى الأنزيم الذي يشفر له الجين aroG. ومن المثير أن يوجد نوعان من الببتيدات المتعددة ذات الوظيفة المزدوجة، وكل منها يشفر لأنزيم chorismate Prephenate dehydratase mutase. إن الحمض الأميني الذي يشفر له بواسطة الجين pheA يكبح بواسطة الحمض L- فينايل الأنين، أما الذي يشفر له بواسطة tyrA فيكبح بواسطة L- تايروسين. وهكذا يعتمد تعبير جين PheA على كمية $tRNA^{phe}$.

2.7.14 سلالات الإنتاج Production strains

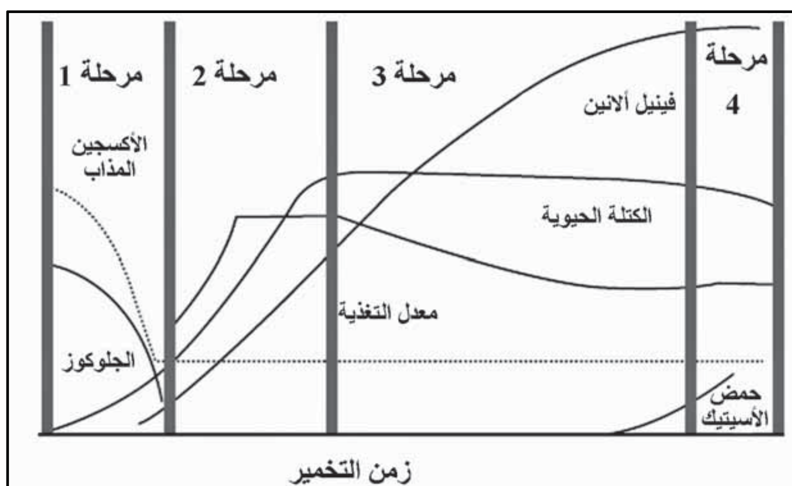
تحتوي السلالات المنتجة على فعالية DAHP المقاومة للكبح الرجعي والمشفر لها إما بواسطة الجين aroF أو الجين aroG، وعلى الأنزيم Chorismate mutase-prephenate dehydratase المقاوم للكبح الرجعي، والمشفر له بواسطة الجين PheA. وكقاعدة، تكون السلالات المنتجة عادة طفرات غذائية للـــ L- تايروسين. وطبعاً هناك أسباب لذلك. أحد هذه الأسباب هي أن الأنزيمات ذات المسار المشترك من DAHP وإلى Prephenate لا يمكن إخضاعها للتنظيم بواسطة L- تايروسين، ولا يمكن تثبيط الفعاليات الأنزيمية بالتثبيط الرجعي. والسبب الآخر هو منع تراكم التايروسين، وإلا فإنه سيتكون كناتج عرضي، لأن هناك فقط خطوتين إضافيتين من الـــ Prephenate إلى L – تايروسين.

وهناك ناحية مهمة أخرى ناتجة من الطفرة الغذائية (Anxotrophy) هي إمكانية الحصول على تحديد مفيد للنمو باستخدام طريقة تغذية مناسبة بالتايروسين (انظر أدناه). في بعض سلالات *E.coli* استخدم الكابت CI 857 (Repressor) الحساس للحرارة والمعزول من العاثية البكتيرية λ مع حفاز λPL promotor للحصول على تعبير قابل للتحفيز في الجينات الرئيسية pheA و aroF. وهذا يمكن من السيطرة العالية على فعاليات الأنزيم أثناء عمليات الإنتاج، وبهذا أيضاً يتم التخلص من المشاكل الموروثة في استقرار السلالة بسبب التراكيز العالية للمواد الأيضية الناتجة. كما أنها تمكن من أداء خطوات الزرعات الأولية وإلى حد استخدام المخمر اللقاحي (Seed Fermenter) تحت ظروف يكون فيها تعبير الجينات

الرئيسية ضعيفاً جداً. ولكن هذه الجينات سوف تحفز في مخمر الإنتاج الكبير لإعطاء مستوى عالٍ من التعبير.

3.7.14 عملية الإنتاج Production process

كما في حالة الأحماض الأمينية الأخرى، فإن الإنتاج الفعال لـــ L– فينايل الأنين هو نتيجة مشتركة للعمليات الأيضية الخلوية المهندسة وراثياً والسيطرة المحكمة على عملية الإنتاج في المخمر. تكون السيطرة على تنظيم العملية الأيضية مهمة لسببين؛ الأول، يجب توزيع دفق الكربون بصورة مثلى بين النواتج الأربعة الرئيسية لعملية تحويل الجلوكوز، وهي L– فينايل الأنين، والكتلة الحيوية، وحمض الخليك (Acetic acid)، و CO_2. والسبب الثاني، هو أن الفيزيولوجية الخلوية لا تكون مستقرة خلال فترة التخمير، وبالتالي هناك حاجة إلى تعديل سيطرة التخمير خلال العملية. يوضح الشكل (22.14) منحنى الزمن النموذجي لإنتاج L– فينايل الآنين. والمشكلة الرئيسية تكمن في ميل بكتريا *E.coli* لإنتاج حمض الخليك الذي له تأثير سلبي قوي في كفاءة العملية. لمنع هذا الأمر، طوّر الباحثون إستراتيجية عبقرية للتغذية بالسكر، وفيها يتم أولاً تجميع بيانات موقعية (On-line) تتعلق بمجريات العملية مثل تركيز الأكسجين، واستهلاك السكر، وتراكيز الكتلة الحيوية.



الشكل 22.14 المراحل الأربع لإنتاج L–فينيل ألانين تتميز بفيزيولوجيا مختلفة وتتطلب أنظمة تحكم في العمليات لإعطاء أعلى العوائد في أقصر الأزمان.

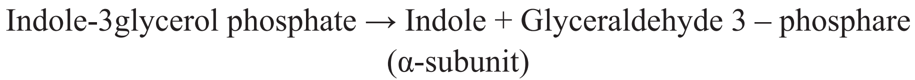
تعاد موازانة هذه النتائج بعد ذلك خلال العملية للسيطرة على الكثافة الأمثل للسكر. وتبدأ تغذية السكر عندما تدخل الخلايا المرحلة 2 من عملية التخمير، حيث يكون الجلوكوز الذي تم تجهيزه أول الأمر قد استهلك تقريباً. والسر هو في منع تكوّن تركيز عالي للجلوكوز لأن هذا سيؤدي إلى تكوين حمض الخليك، وبنفس الوقت، لمنع انخفاض تركيز الجلوكوز الذي يقود إلى إنتاج مفرط للـــ CO_2 . وبهذا يجب أن يكون معدل تغذية السكر وسطياً بحيث تجري العملية بأعلى معدل تغذية ممكن، وبنفس الوقت يتم فرض محددات قوية لمنع إفراز حمض الخليك. عندما يتم استهلاك L- تايروسين الموجود أصلاً، تتحرك الخلايا نحو المرحلة 3. وكما ذكر سابقاً، فإن جميع السلالات المنتجة للـــ L- فينايل الأنين، تقريباً، هي طفرات تايروسين غذائية (Tyrosine auxotrophs). عليه، يتم اختيار تركيز L- تايروسين في بداية عملية الزرع، وبهذا يتم تحديد الكمية الدنيا من الكتلة الحيوية الضرورية لاستهلاك كمية الجلوكوز المقرره مسبقاً. تتضاءل القدرة الأيضية للخلايا في المرحلة 3 مما يؤدي إلى اختزال في معدل تغذية الجلوكوز. ويبدأ إفراز حمض الخليك في نهاية المرحلة 3 وقبل أن تدخل الخلايا المرحلة 4 التي لا يحدث فيها تراكم إضافي للـــ L- فينايل الأنين وحينها تتوقف العملية فعلاً. يوضح هذا المثال الخاص بإنتاج الحمض الأميني إمكانية الحصول على تراكيز عالية جداً من L – فينايل الأنين مع محصول نهائي عالٍ خلال يومين ونصف إذا استخدمت طرق متقدمة في استراتيجيات التغذية، وطرق سيطرة قابلة للتكيف. لقد تم بهذه الطريقة تسجيل قيم عالية تبلغ 50.8 غم/لتر من L- فينايل الأنين وبمحصول يبلغ 27.5% في يومين ونصف فقط من بداية العملية.

8.14 L- تريبتوفان L-Tryptophan

1.8.14 الكيمياء الحيوية Biochemistry

إن L-تريبتوفان حمض أميني غالي السعر، ولكن حجم مبيعاته صغير. إنه أحد الأحماض الأمينية المرشحة للاستعمال في إضافة تحسينات إلى العلف الحيواني. وتتوفر عمليات إنتاج فعّالة لهذا الحمض الأميني باستعمال طوافر من بكتريا *E.coli*

و *C.glutamicum* و *Bacillus subtilis*. علماً أن التخليق الأنزيمي الفعّال للـ L- تريبتوفان، باستخدام بادئات (Precursors) رخيصة للحصول على منتوج فائق النقاوة، لا زال مستخدماً. يعتمد هذا النوع من الإنتاج على فعالية الأنزيم Biosysnthetic tryptophan synthase (شكل 23.14). الذي يحفز الخطوة الأخيرة من عملية تخليق التريبتوفان والتي تتكون من تفاعلين جزئيين:

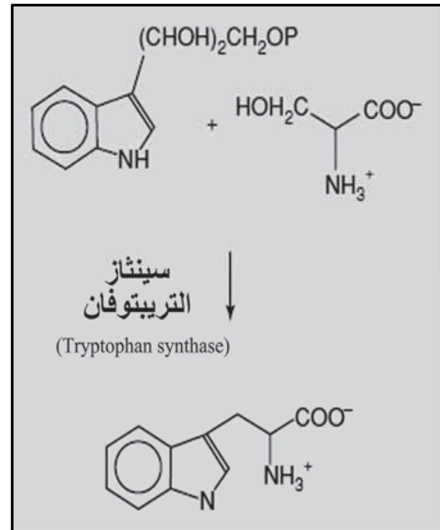


Indole-3glycerol phosphate → Indole + Glyceraldehyde 3 – phosphare (α-subunit)



Indole + L-serine → L-tryptophan+H_2O (β_2 – subunit)

يحفز هذان التفاعلان المنفصلان بواسطة وحدات ثانوية منفصلة من الأنزيم وهما α و β. إن الأنزيم الموجود في *E.coli* هو α_2 β_2 رباعي السلسلة (Tetramer)، الذي يمكن أن ينفصل ليكون وحدات ثانوية فعالة من النوعين α و β. تحفز وحدات α الثانوية تفاعل انشطار مادة Indole-3-glycerol phosphate، في حين تحفز الوحدة الثانية – β_2 عملية تكثيف L – سيرين مع الأندول لتكورين L–تريبتوفان. وهذا التفاعل الأخير هو الذي يستغل في الإنتاج الصناعي.

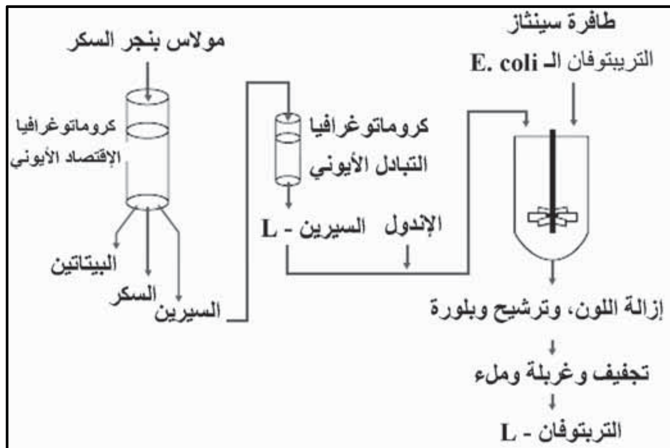


الشكل 23.14 التريبتوفان سينثاز يستخدم بشكل طبيعي الإندول 3 جيليسرول فوسفات، بالإضافة إلى L- سيرين، ولكن في عملية الإنتاج يستخدم الإندول زائد L- سيرين بمثابة مواد أولية.

2.8.14 الإنتاج من البادئات Precursors

يعتمد الإنتاج على استعمال خلايا *E.coli* التي تحتوي على فعالية عالية لأنزيم تريبتوفان سينثاز (Tryptophan synthase). إن الجين TrpA والجين

Trp B اللذين يشفران للوحدتين الثانويتين α و β على التوالي، يقعان في أوبيرون Trp EDCBA الذي ينظم عن طريق الكبت (Repression) والتضعيف (Attenuation). وفي طفرة *E.coli* المستخدمة لهذا الغرض تم حذف كابت هذا الأوبيرون، لأنه جزء من منطقة المُضعِّف، مع حذف الجينات البنيوية الأولى للأوبيرون. ونتيجة لذلك فإن حوالى 10% من البروتين الكلي هو Tryptophan synthase مع زيادة في عدد الوحدات الثانوية – β الموجودة. وبالرغم من أن الأندول ليست المادة الأولية الحقيقية، إلا أن وجود تركيز عالٍ كافٍ من أنزيم Synthase، وكذلك وجود الوحدات الثانوية – β يعملان على التفاعل معها. ويمكن الحصول على الأندول من الصناعات النفطية كمصدر رخيص، في حين أن المصدر الثاني، L– سيرين، يتم استرجاعه من المولاس خلال عملية تكرير السكر، باستخدام غروماتوغرافيا التبادل الأيوني، وخطوات تنقية أخرى (شكل 24.14). يضاف الأندول باستمرار بتركز نهائي مثبت قدره 10 ملي مول، ويتم السيطرة عليه خلال العملية On-Line. تضمن هذه الطريقة تحولاً كمياً للأندول لإنتاج L–تريبتوفان، وبمحصول يقدر بحوالى 75 غم/لتر/يوم. إن المعالجات الأخرى لمحلول L– تريبتوفان يمكن أن تؤخذ من الشكل (24.14)، وهي تقود إلى تكوين منتوج صيدلاني عالي النوعية وخالٍ من مولدات الحمى (Pyrogen free).



الشكل 24.14 مخطط لاستخدام L – سيرين المشتق من المولاس جنباً إلى جنب مع الإندول ليعملا بمثابة مواد أولية في التحول الأحيائي إلى التريبتوفان. يتم هذا التحول مع خلايا *E.coli* مزروعة مسبقاً وعندها نشاط أنزيم تريبتوفان سينثاز عالٍ.

9.14 L-أسبارتات *L-Aspartate*

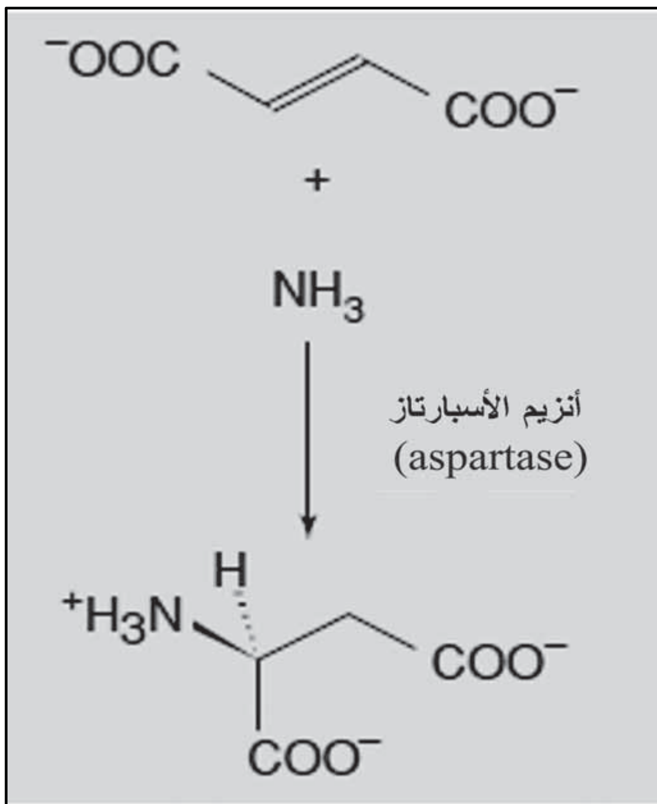
1.9.14 الكيمياء الحيوية **Biochemistry**

يستخدم حمض الأسبارتيك (L-Aspartic acid) بشكل واسع كمضاف غذائي، وفي المواد الصيدلانية. إزداد الطلب على هذه المادة بسرعة عندما بدأ إنتاج الـــ Aspartame كمادة مُحلّية. وهذه المادة عبارة عن ببتيد ثنائي تتكون من L-aspartate و L-phenylalanine وتكون أكثر حلاوة من السكر بحوالى 200 مرة، وتم تقديمها إلى السوق بنجاح كمادة مُحَلّية ذات سعرات حرارية قليلة.

على الرغم من أن L-aspartate كان ينتج أصلاً بواسطة التخمير، إلا أنه ينتج الآن بالكامل باستخدام أنزيم Aspartase بسبب الإنتاج العالي للعملية ولرخص تكاليفها، وهو من أعلى الإنتاجات المعروفة عن الأنزيمات المستخدمة في التقانة الحيوية (لاحظ كذلك الفصل الرابع والعشرين). تسمح الطريقة المطورة بإعادة استخدام الأنزيم إلى درجة أنه من الممكن إنتاج 220000 كغم من المنتوج لكل كيلوغرام من الأنزيم.

يحفز أنزيم أسبارتيز Aspartase التحول المتبادل بين L-Aspartate والـــ Fumarate + الأمونيا (الشكل 25.14). ويفضل التفاعل عادة بتفاعل إضافة الأمين (Amination). إن الأنزيم الموجود في *E.coli* رباعيٌّ السلسلة (Tetramer) وبوزن جزيئي قدره 196000 دالتون وذو حاجة ماسة للأيونات المعدنية الثنائية. وإن إحدى المساوئ الكبيرة التي ظهرت في بداية الدراسات التي أجرتها شركة Tanabe Seiyaku Co. Ltd، التي استخدمت Aspartase بنجاح، عدم استقرارية الأنزيم. فعند حضن الأنزيم في محلول لمدة نصف ساعة فقط بدرجة 50°C يلاحظ اختفاء فعاليته. مع ذلك، لوحظ بقاء 10% من فعاليته عندما تم تقييد الأنزيم في البولي أكريلامايد (Polyacrylamide). لقد ظهر أن هذا النوع من التقييد الفيزيائي للخلايا يمثل الطريقة الأفضل. ويوضح الجدول (3.14) أن استخدام البوليمر الطبيعي k-Carrageenan، الناتج من غربلة عدة بوليمرات، واستعمال مواد رابطة مناسبة يؤدي إلى تحسين هائل في الإنتاجية النسبية وفي

استقرارية الأنزيم في المحلول. فالمادة النهائية لديها عمر نصف معدله سنتان، وهذا يمثل تقدماً غير متوقع مقارنةً بالبداية حيث كان للأنزيم آنذاك عمر نصف يقاس بالدقائق فقط. ومن المساوىء الأولية للخلايا الأصلية التي استعملت احتواؤها على فعالية أنزيم Fumarase التي تنتج تحولاً جزئياً للـــ Fumarate إلى L-Malic acid. ولتجاوز هذه المشكلة أضيفت خطوة المعاملة الحرارية للخلايا التي تزيل فعالية هذا الأنزيم بالكامل تقريباً. وباستخدام مثل هذه الخلايا المكيفة واعتماد تركيز من واحد مولار من Ammonium fumarate فإن المحلول النهائي للمنتوج سيحتوي على 987 ملي مولار من L-Aspartate و 10.7 ملي مولار من Fumarate غير المتفاعل مع كميات قليلة جداً (1.9 ملي مولار) من حمض الماليك (L-Malic acid).



الشكل 25.14 الفيومارات والأمونيا بمثابة مواد أولية للأسبارتاز.

الجدول 3.14: مقارنة لإنتاجية خلايا *E.coli* مقيدة الحركة إنتاج L–أسبارتات

طريقة تقييد الحركة باستخدام:	فعالية الأسبارتاز في (مايكروغرام خلايا)	عمر النصف (أيام)	الإنتاجية النسبية (%)(**)
بولي اكريلامايد (Polyacrylamid)	18850	120	100
كاراجينان (Carrageenan)	56340	70	174
كاراجينان (GA)(*)	37460	240	397
كاراجينان (HA+GA)(*)	49400	680	1498

(*) Glutaraldehyde = GA ، Hexamethylene diamine = HA

(**) يؤخذ بالاعتبار الفعالية في البدء، وثابت التأكل، وفترة العملية.

يتم، أثناء عملية الإنتاج، رصف الخلايا مقيدة الحركة في عمود صمم على شكل نظام متعدد المراحل. يتكون كلٌّ من هذه المراحل من مجموعة أنابيب أفقية متوازية التي تخدم غرضين: الغرض الأول، هو أنها تسمح بعملية تبريد فعالة لمنع تآكل الفعالية الأنزيمية لأن تفاعل أنزيم الــ Aspartase هو تفاعل محرر للطاقة (Exergonic) حيث يتحرر حوالى 6 كيلو سعرة حرارية لكل مول من المادة الأولية في عمليات الإنتاج الضخم الحقيقية. وهذه تكون قريبة جداً من القيمة المحسوبة من خلال التغير القياسي حر الطاقة لتفاعل أنزيم Aspartase التي مقدارها 4 كيلو سُعرة/ مول. أما الغرض الثاني فهو زيادة خصائص سريان العمود. فهي تمنع أي انضغاط لمهد العمود مع مرور الوقت، وبهذا يتم الحصول على خاصية سريان جيدة في العمود. ويمكّن الحصول على معدل سريان بحجم عمودين في الساعة. هذا وتسمح العملية المستمرة باستخدام الأتمتة الكاملة

والسيطرة الذاتية على العملية للوصول إلى الإنتاجية الأمثل وبأعلى نوعية للمنتوج. وهنالك فائدة أخرى لمثل هذه العملية المستمرة والمسيطر بالكامل عليها وهي اختزالها لكمية الفضلات المنتجة.

إن الفعالية الحجمية النموذجية هي حوالى 200 ملي مول/ساعة/ غم خلايا. وبافتراض استخدام عمود حجمه 1000 لتر، فإن محصول الـ L–أسبارتيت سيكون 3,4 طن باليوم الواحد، أي 100 طن بالشهر. ويتم تنقية المنتوج النهائي لاحقاً باستخدام البلورة.

10.14 نظرة مستقبلية Outlook

على الرغم من أن الأحماض الأمينية هي الآن من بين المنتوجات التقليدية في التقانة الحيوية، إلا أن الطلب عليها في زيادة مستمرة وبشكل كبير. وعليه فإن المطلوب هو التحسين الدائم للعملية، حيث يجب تطوير تقنيات جديدة وتعميق فهمنا للقدرات غير الاعتيادية للسلالات المنتجة. ولقد تم تجميع معلومات جديدة مدهشة ذات فائدة عامة للفسلجة الخلوية مثل وجود نواقل تصدير متخصصه، أو وجود دفق دوراني ضمن التفاعلات المكملة.

علاوة على ذلك فقد تم الحصول على معلومات كثيرة من عمليات تطوير السلالات بالارتباط مع تقنية التخمير والعلم الجديد المسمى الهندسة الأيضية (Metabolic Engineering)، ومناطق الاتصال بينهما. بالحقيقة، إن إنتاج الأحماض الأمينية هو مثال رائع للتكامل بين عدة تقنيات مختلفة. وبهذا، فإن الأعمال اليابانية المبكرة على طَعم مادة عشبة البحر (Kelp) قد أرست الحجر الأساس لعمليات إنتاج أحماض أمينية بشكل مستمر وناجح ومزدهر.

شكر وتقدير

نود أن نشكر التالية أسماؤهم لتقديمهم مواد هذا الفصل:

R. Faurie, Amino GmbH; K. Ikeda, Ajinomoto Ltd; N. Kato, Kyoto University; Y. Kawahara, Ajinomoto Ltd; W. Leuchtenberger and G. Thierbach, Degussa AG; T. Shibasaki, Kyowa Hakko Kogyo; T. Tosa, Tanabe Seiyaku

11.14 قراءات إضافية Further reading

Bongaerts, J., M. Krämer, U. Müller, L. Raeven, and M. Wubbolts, “Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds.” *Metabolic Engineering,* vol. 3 (2000), pp. 289-300.

Chibata, I., T. Tosa, and T. Shibatani, “The Industrial Production of Optically Active Compounds by Immobilized Biocatalysts.” in: A. N. Collins, G. N. Sheldrake and J. Crosby, eds., *Chirality in Industry*. London: John Wiley and Sons, 1992.

Debabov, V. G. “The Threonine Story.” *Advances Biochemical Engineering,* vol. 79 (2003), pp. 136-143.

De Graaf, A. A. “Metabolic flux analysis of Corynebacterium glutamicum.” in: K. Schügerl and K. H. Bellgardt, eds., *Bioreactor Engineering, Modeling and Control.* Berlin: Springer-Verlag, 2000, pp. 506--555.

Eggeling, L. and M. Bott, *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

Hodgson, J. “Bulk Amino Acid Fermentation: Technology and Commodity Trading.” *Bio/Technology,* vol. 12 (1994), pp. 152-155.

Eggeling, L. and H. Sahm, “New Ubiquitous Translocators: Amino Acid Export by Corynebacterium glutamicum and Escherichia coli.” *Archives of Microbiology,* vol. 180 (2003), pp. 155-160.

Ikeda, M. “Amino Acid Production Processes.” *Advances Biochemical Engineering,* vol.79 (2003), pp. 1-35.

Konstantinov, K. B., N. Nishino, T. Seki, and T. Yoshida, “Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production.” *Journal of Fermentation and Bioengineering,* vol. 71 (1990), pp. 350-355.

Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, and M. Hayashi [et al.]. “A Novel Methodology Employing Corynebacterium glutamicum genome Information to Generate a New l-lysine-producing mutant.” *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 58 (2002), pp. 217-223.

الفصل الخامس عشر

الأحماض العضوية

Organic Acids

Christian Kubicek **كريستيان كوبيجيك**

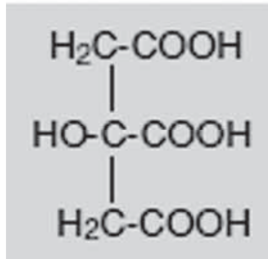
Instituate for verfahrenstechnic, Unwelthechnick and Tech, Austria **معهد العلوم التطبيقية والتقانة البيئية – النمسا**

Leventa Karaffa **ليفينتا كارافا**

University of Debrecen , Hungary **جامعة دبريسين – هنغاريا**

1.15 المقدمة Introduction

ينتج العديد من الأحماض العضوية المختلفة بواسطة أنواع مختلفة من الكائنات المجهرية حقيقية وبدائية النواة. وبالنسبة إلى البكتريا اللاهوائية يكون إنتاج هذه الأحماض وسيلة يمكن من خلالها إعادة تكوين NADH، وبهذا فإن تراكم هذه الأحماض يكون موازياً للنمو (مثلاً، حمض اللاكتيك، وحمض البروبيونك...إلخ)، لاحظ الفصل الثاني. على العكس من ذلك، فإن تراكم الأحماض العضوية في البكتريا الهوائية والفطريات هو نتيجة أكسدة غير كاملة للمادة الأولية، وينشأ عادة من عدم التوازن في بعض المغذيات الأساسية، مثل الأيونات المعدنية. وعلى الرغم من الاختلاف التام في المتطلبات الفسلجية لصنع هذه المنتجات، فسوف لا نتطرق إلى التمييز بين هذين النوعين من المنتوجات في هذا الفصل. إن الأحماض العضوية التي سيتم شرحها أدناه هي تلك التي تصنع بكميات كبيرة (انظر الجدول 1.15) التي تسوق على شكل كيميائيات نقية نسبياً أو بشكل أملاح.



الشكل 1.15: حمض الستريك.

الجدول 1.15: الإنتاج السنوي للأحماض العضوية الرئيسية التي يتطرق إليها هذا الفصل	
الحمض	**الإنتاج (كيلوطن/السنة)**
حمض الستريك	900
حمض الجلوكونيك	60
حمض اللاكتيك	50
حمض الاسكوربيك	60

2.15 حمض الستريك Citric acid

اكتشف حمض الستريك

(2-hydroxyl – propane – 1.2.3 – tricarboxylic acid)

(انظر الشكل 1.15) أولاً كمكّون من مكوّنات الليمون، ولكنه بات يعرف اليوم كمادة وسطية في دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل (Tricarboxylic acid) ولهذا فإنه يتواجد في كل كائن حي تقريباً. كان هذا الحمض ينتج في الأصل من قبل الاحتكارات الإيطالية من الليمون، ولكن اكتشاف إنتاجه في الفطر *Aspergillus niger* (غيّر اسمه بعد ذلك إلى Citromyces). في بدايات عقد العشرينيات من القرن الماضي الذي أدى إلى التطور السريع لعملية التخمر حتى أصبحت، بعد 15 سنة، مسؤولة عن أكثر من 95% من الإنتاج العالمي لحمض الستريك.

1.2.15 السلالات الميكروبية والمسارات الكيموحيوية لتراكم حمض الستريك

Microbial strains and biochemical pathways of citric acid accumulation

معظم حمض الستريك المنتج هذه الأيام مصدره الفطر *A. niger*. وإن السلالات الصناعية لهذا الفطر هي من بين أكثر السلالات المحفوظة بصورة سرية، في مجال التقانة الحيوية مما يمنع كذلك معرفة الاستراتيجية المستخدمة في عزلها خلال مراحل انتقاء السلالة وتطويرها. ومع أن عدة طرق لعزل الطفرات قد نشرت من قبل المختبرات الأكاديمية، وتشمل تلك التي توفر درجة تحمّل للتراكيز العالية من السكر، و desoxyglucose – 2، ومثبطات السلسلة التنفسية، وفلورواسيتيت (Fluoroacetate)، والرقم الهيدروجيني المنخفض وغيرها من العوامل، إلا أن أهمية هذه الاستراتيجيات للمعرفة الصناعية لم يكشف عنها. وقد ركزت الاستراتيجيات الأخرى في الدرجة الأولى على التقليل من، أو منع تكوين النواتج العرضية، مثل حمض الأوكزاليك وحمض الجلوكونيك (لاحظ أدناه). ولقد تم حديثاً إكمال تحديد تتابع الجينوم للفطر A. niger

(انظر <http://www.gene.alliance.com/start.htm>)، وتم تشخيص 13000 جين، موجودة في حوالى 34.5 مليون زوج قاعدي (Base pairs) ، من خلال فحص كامل التتابع المكرر ثماني مرات.

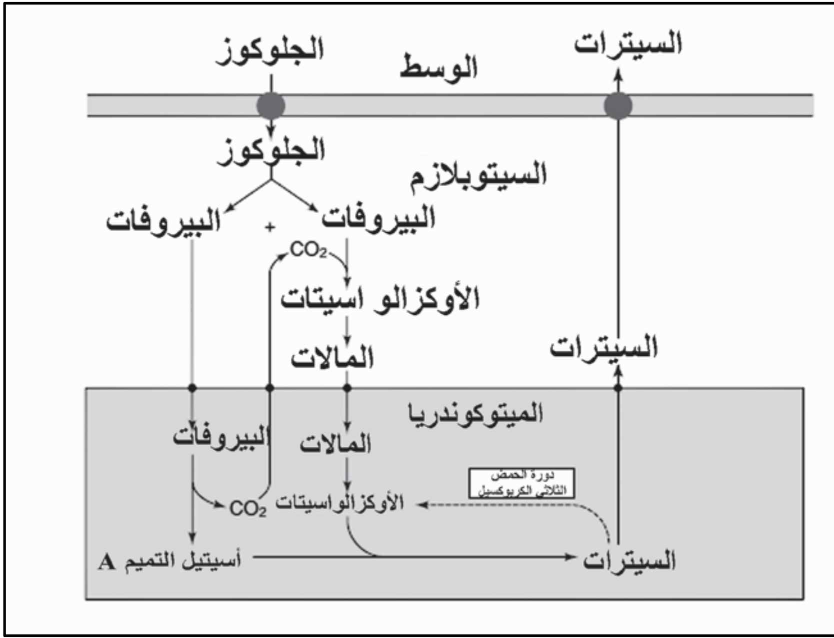
تسمح هذه المعلومات في الوقت الحاضر بتصميم صفيفات DNA (انظر الفصل الخامس)، التي يمكن استخدامها في ما بعد في تشخيص الجينات التي يكون مقدار ارتفاع وخفض تنظيمها متطابقاً مع تطوير السلالة، ونجاح التخمير، وتأثير العوامل ذات الفعل الضار.

بالإضافة إلى الفطر *A.niger*، فقد وصفت عدة خمائر (Yeasts) قادرة على إنتاج كميات كبيرة من حمض الستريك من مادة n-alkanes، ولكن بمحصول أقل، من الجلوكوز. تشمل هذه الخمائر الأنواع *Candida catenula* (سابقاً: *C. brumptii*, *C. guilliermiondii, Yarrowia lipolytica*, *C.*

tropicalis. إن أحد أهم مساوئ استخدام هذه الخميرة هي إنتاجها المتزامن لحمض الأيزوسترك (Isocitric)، والذي يمكن أن يمثل 50% من حمض الستريك المنتج، خاصة عند استعمال n-alkanes كمادة تغذية أولية. (ومع أن حمض أيزوسترك هو بنفس فائدة حمض الستريك في معظم الأغراض، ولكن لا يمكن بيعه كحمض ستريك لأنه وببساطة، يختلف). لهذا السبب، فقد أجريت محاولات عديدة لعزل طفرات تظهر فعالية منخفضة (حوالى 1% من فعالية النوع البري) لأنزيم Aconitase (لاحظ الأشكال 9.2 و2.15)، وذلك باستخدام المقاومة لمادة مونوفلوروواستيتيت (Monofluoroacetate) كصفة انتقائية.

تشتمل المسارات الكيموحيوية لتكوين حمض الستريك على عملية تحلل جلايكول هدمية (Glycolytic catabolism) لسكر الجلوكوز وإنتاج مولين إثنين من البايروفيت (Pyruvate) وتحويله لاحقاً إلى مولدات (Precursors) للستريت، والأوكزالوأسيتيت، والبايروفيت (الشكل 2.15).

وهنالك خطوة مفتاحية في هذه العملية هي استخدام مول واحد من البايروفيت والـــ CO_2 المتكون في تخليق Acetyl Co. A وذلك لتكوين الأوكزالوأسيتيت (تفاعل كليلاند – جوهسن – Cleland– Johsen Reaction). ولقد أصبحت أهمية هذه الخطوة واضحة من خلال حسابات بسيطة: إذا كان تكوين الأوكزالوأسيتيت المطلوب في عملية التخليق الحيوي للسترات (Citrate) ينتج بواسطة دورة واحدة من دورات حمض Tricarboxylic، فإن هذا يعني فقدان مولين اثنين من CO_2، وبالتالي سيتراكم ثلثان من كربون الجلوكوز كحمض ستريك، أو 0.7 كغم/كغم سكر. ومع أن المحصول العملي هو أعلى من ذلك بكثير، إلا أنه مع ذلك يتفق تماماً مع تخليق الأوكزالوأستيت بواسطة التفاعل المكمل لتثبيت CO_2 (أي، تفاعل يهدف عادة إلى موازنة الكربون المطلوب لأغراض التخليق الحيوي: بواسطة أنزيم Pyruvate carboxlyase. وبالإضافة إلى ذلك فإن تفاعل أنزيم Pryuvate carboxlyase له تبعات مهمة أخرى في التخليق الحيوي لحمض الستريك: على خلاف ما هو موجود في العديد من الكائنات حقيقية النواة الأخرى.



الشكل 2.15: مخطط أيضي مبسط للتخليق الحيوي لحمض الستريك. تم حذف التفاعلات الجانبية والمواد الوسطية التي ليس لها علاقة بالتخليق الحيوي لحمض الستريك.

إن أنزيم Pyruvate carboxylase في الفطر *A. niger* يتمركز في السايتوسول (Cytosol)، وبهذا فإن الأوكزالوأستيت المتكون ستيم تحويله إلى ماليت (Malate) بواسطة أنزيم Malate dehydrogenase الموجود في السايتوسول (الشكل 2.15)، مما يعني كذلك تجديد 50% من الـــ NADH المنتج بواسطة Glycolysis. إن هذا الاستعداد المسبق للماليت الموجود في السايتوسول كناتج نهائي لعملية الـــ Glycolysis ذو أهمية فائقة لتدفق حمض الستريك لأنه المادة الأولية – المساعدة لناقل حمض Tricarboxylic المايتوكوندريالي (Mitochondrial) في الكائنات حقيقية النواة.

في حين أن المسار الكيموحيوي لتخليق حمض الستريك، وكما هو موضح في الشكل (2.15)، مدعوم تجارياً وبشكل جيد، فإن سبب تراكم حمض الستريك بمحصول مولاري يصل إلى 90% من الجلوكوز المستهلك لا زال غير مفهوم بالكامل. وكان الاعتقاد سائداً في السابق أن تثبيط الأنزيمات المحطمة للسترات

(Citrate) (مثل Aconitase أو Isocitrate dehydrogenase) هي السبب الرئيسي في تراكم حمض الستريك، ولكن بعد أن توفرت دلائل قوية على وجود دورة حمض ستريك متماسكة خلال عملية تخمير حمض الستريك، فقد تم التخلي عن تلك الاعتقادات السابقة. إن الأكثر احتمالاً هو وجود تنظيم دقيق، لواحد أو أكثر من الأنزيمات المحطمة للستريت بواسطة مواد أيضية، قد يكون له علاقة بتراكم حمض الستريك. ومع أن هناك احتمالاً قوياً آخر بأن تراكم السترات قد يكون ناتجاً من عملية تخليق حيوي محسنة وغير خاضعة للتنظيم. هذا ويمكن الحصول على تفاصيل أكثر للآليات المقترحة المختلفة والدلائل المقدمة لإسناد كل منها، من بعض الاستعراضات والبحوث العلمية المنشورة والموضحة في الجزء (6.15).

2.2.15 تنظيم تراكم حمض الستريك بواسطة مقاييس غذائية

Regulation of citric acid accumulation by nutrient parameters

في حين يمكن لحمض الستريك أن يتراكم بكميات كبيرة، فإن مثل هذا التراكم يلاحظ فقط تحت مجموعة متشددة من الظروف الغذائية الخاضعة للسيطرة (أي، تراكيز زائدة من مصدر الكربون، وH^+، والأكسجين المذاب، مع وجود تراكيز أقل من المثلى لبعض المعادن الضئيلة والفوسفات). بالحقيقة، أثناء نمو *A. niger* في وسط زرعي قياسي لإنماء الفطريات فإن تراكم حمض الستريك يكون قليلاً إن لم يكن معدوماً. وتختلف الظروف المطلوبة للحصول على المحصول الأمثل باختلاف نوع التخمير (لاحظ أدناه)، وإن هذه الظروف تكون ذات أهمية أكبر في حالة عمليات التخميرات المغمورة. الجدول (2.15) يوضح الظروف المثلى المشروحة أدناه.

الجدول 2.15 الشروط المثلى لإنتاج حمض الستريك	
تركيز السكر غم/لتر	120-250
Mn, M	$<10^{-8}$
Zn, M	$<10^{-6} – 10^{-7}$
Fe.M	$<10^{-4}$
شد الأكسجين الذائب، mbar	>140
تركيب PH	1.6 – 2.2
الفوسفيت غم/لتر	0.2-1.0
أملاح الأمونيوم غم/لتر	>2.0
الزمن، ساعة	160-240

نوع السكر والتركيز Sugar type and concentration

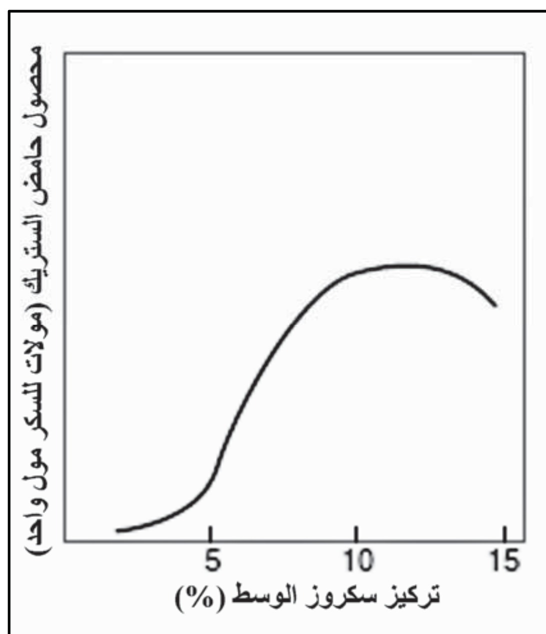
إن نوع وتركيز المصدر الكربوني هو المعيار الأكثر أهمية في نجاح عملية إنتاج حمض الستريك، وهو مهم في حالة التخميرات المغمورة (Submerged)، وكذلك في عمليات الإنتاج السطحية. إن السكريات التي يمكن هدمها بسرعة بواسطة الفطر مثل السكروز، والمالتوز أو الجلوكوز هي فقط التي تسمح بمحصول عالٍ ومعدل تراكم مقبول لحمض الستريك.

الجدول 3.15: المواد الخام المستعملة كمصادر كربون لإنتاج حمض الستريك	
مولاس السكر الأسود (Blackstrap molasses)	مخلفات القطن (Cotton waste)
مولاس قصب السكر (Cane molasses)	ناضح الشرش (Whey permeate)
تُفلّ القصب (Bagasse)	مخلفات مصانع البيرة (Brewery waste)
النشا (Starch)	لب البطاطا الحلوة (Sweet potato pulp)
دبس التمر (Date syrup)	ماء مخلفات الأناناس (Pinapple waste water)
تُفلّ التفاح (Apple pomace)	مستخلص الموز (Banana extract)

خلال العمليات الصناعية التي تجري حالياً، يشيع استعمال مولاس البنجر السكري وقصب السكر كمواد خام لمصدر الكربون. علماً أن كلا نوعي المولاس يظهران اختلافات كبيرة في النوعية من فصل إلى آخر، أو من معمل تكرير إلى آخر. لقد تم تشخيص عدد من المكونات المتواجدة في المولاس والتي لها تأثير في إنتاج حمض الستريك، ولكن، وبما أن التركيب الكلي معقد جداً، لا توجد إلى حدّ الآن استراتيجية عامة لتقييم النوعية. وبهذا، فإن اختيار المادة الأولية لاستخدامها في عملية التخمير لايزال يعتمد على كيفية أدائها في المخمرات ذات الحجوم الصغيرة (5 إلى $10\ m^3$). (غالباً ما تمزج وجبة مولاس جيدة مع وجبة رديئة لكي يتم استخدام المزيج في العملية) وقد أثبت كذلك وعلى مستوى المختبر إمكانية استعمال بدائل أخرى

كمواد أولية (الجدول 3.15). ومن بين هذه البدائل استخدام شراب الجلوكوز الذي كان يقتصر استعماله، إلى حد ما، على الولايات المتحدة فقط بسبب التقييدات التنظيمية في أوروبا. إلا أن هذا التوجه قد تغير بسبب زيادة توفر (والضغط على استعماله) مواد فضلات مختلفة تحتوي على بوليمرات الجلوكوز.

إن تركيز مصدر الكربون المستعمل في إنتاج حمض الستريك يكون عالياً جداً (100 إلى أكثر من 200 غم/لتر)، الذي يبدو منطقياً عندما يراد الحصول على منتوج عمومي بشكل اقتصادي. كما وقد لوحظ كذلك أن لتركيز مصدر الكربون تأثيراً في عملية تنظيم الإنتاج الزائد للسترات، حيث يقل المحصول من الجلوكوز (غم/غم) بشكل كبير عندما يقل تركيز الكربون إلى أقل من 100 غم/لتر (الشكل 3.15). وعندما يكون تركيز السكر أقل من 50 غم/لتر فإن كمية حمض الستريك تكون قليلة جداً.



الشكل 3.15: تأثير تركيز السكر في محصول حمض الستريك المولاري Yps (عدد مولات حمض الستريك المنتج لكل مول مستهلك من السكر (محسوب على أنه جلوكوز) محصول حمض الستريك (مول/مول سكر).

بالنسبة إلى الأساس الكيموحيوي للعلاقة بين تراكم حمض الستريك وتركيز السكر، فإن التركيز العالي للسكر يحفز على نظام نقل إضافي للجلوكوز. وإن الزيادة في أخذ الجلوكوز تحت ظروف التجهيز العالي للسكر سوف تعمل ضد كبح أنزيم Hexokinase بواسطة Trehalose 6-phosphate. وقد تم الحصول على دعم لهذه النظرية من حقيقة كون سلالات *A.niger* التي حذف منها الجين المشفر لأنزيم Trehalose 6-phosphate synthase أظهرت زيادة في معدل تراكم حمض الستريك حتى بوجود تراكيز سكر منخفضة. علاوة على ذلك، فإن تركيز الخلية لمادة Fructose, 2,6-biphosphate (F2, 6p2) ترتفع باستخدام تراكيز عالية من السكر. إن F2,6p2 هو أقوى محفز لأنزيم Phosphofructo kinase الذي قد يزيد من الدفق الكلي للـــ glycolysis.

الأيونات المعدنية الضئيلة Trace metal ions

إن الأثر التغذوي للمعادن الضئيلة (Trace metal) معروف ومنذ فترة طويلة وكان شيئاً رئيسياً في تأسيس عمليات تخمير ناجحة، على الرغم من أن هذا التأثير هو أكثر وضوحاً في التخميرات المغمورة مما هو عليه في التخميرات السطحية (انظر الجزء 15−2−3). وفي حين أن جميع الأيونات المعدنية الضئيلة الاعتيادية (Co, MnK Cu, Zn, Fe) تكون ضرورية لنمو *A.niger*، فإن بعضها – وبالذات Mn^{+2}، Fe^{+3}، Zn^{+2} – يجب أن تتواجد في الوسط بتراكيز محددة النمو لأجل إعطاء محصول عالٍ من حمض الستريك، إلا أن تأثير أيونات المنغنيز بالذات ملفت للنظر، حيث إن تراكيز بمستوى 2µg/l تؤدي إلى اختزال تراكم حمض الستريك بحوالى 20%. إن تراكيز الأيونات المعدنية، التي دونها يمكن لحمض الستريك أن يتراكم بكميات عالية، ليست مطلقة، ولكنها مع ذلك تعتمد على نسبتها إلى المغذيات الأخرى، وبالذات الفوسفات.

بما أن تراكيز الأيونات المعدنية التي تؤثر في إنتاج حمض الستريك تضاف بشكل عرضي إلى الوسط بواسطة التراكيز العالية لمصدر الكربون، فإن جميع مصادر الكربون التي يراد استخدامها في تخميرات حمض الستريك يجب أن

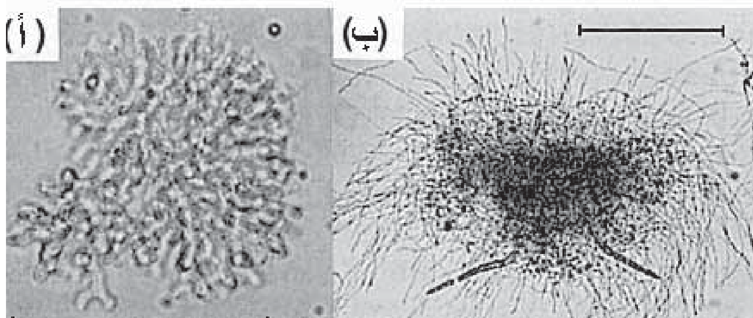
تُنقَّى بحيث تكون خالية من الأيونات المعدنية. يمكن عمل هذا الشيء بطرق مختلفة، مثلاً: بواسطة الترسيب، أو بواسطة التبادل الكاتيوني الذي يستعمل عادة فقط مع شراب الجلوكوز. إن تنقية مصادر الكربون الصناعية، مثل مولاس البنجر السكري أو قصب السكر، هي أكثر أهمية، وهي تجري عادة من خلال عمل معقدات مع سيانيد الحديد (Ferrocyanide)، وترسيبها لاحقاً، والتي تبدي تأثيراً مفيداً في عملية الأيض المكونة لحمض الستريك في *A. niger*. البديل هو إلغاء تأثير المعادن الضئيلة إما عن طريق إضافة النحاس (Copper) الذي يمنع نقل المنغنيز إلى شعيرات المايسيليا (Mycelia)، أو عن طريق إضافة كحولات واطئة، أو دهنيات، التي قد تسرّع دفع حمض الستريك من الخلايا.

قدمت فرضيات مختلفة لتوضيح الأسس الكيموحيوية للحاجة إلى تحديد تركيز الأيونات المعدنية الضئيلة، ولكن إلى حدّ الآن لا يوجد توضيح مقنع لهذا الشيء. ولقد درس تأثير Mn^{+2} بشكل مفصل. ويبدو أن التأثير متعدد الجوانب، فقد لوحظ أن التراكيز المحددة لأيونات Mn^{+2} تزيد من دفق الكربون خلال دورة الـــ Glycolysis، وتغيّر من تركيب غشاء البلازما للفطر *A. niger* ، ويضعف تخليق (DNA)، ويقلب البروتينات، لا سيما تلك التي تدخل في تكوين سلسلة التنفس القياسية، وبالتالي تؤدي إلى إضعاف التنفس. إن الزيادة في تحطم البروتين يرفع كذلك من تركيز NH_4^+ داخل الخلية الذي بدوره يحفز فعالية أنزيم Phosphofructokinase. إن هذا التأثير، مقروناً بزيادة تركيز F2 ،6P2 (انظر أعلاه)، سوف يعمل ضد التأثير المثبط للسايتريت في فعالية أنزيم Phosphofructokinase. إن التأثير المدهش الآخر لقلة تركيز المنغنيز على عدة فطريات، ومن ضمنها أنواع الفطر *Aspergillus*، هو تأثيره في الشكل المظهري للفطر: فالمايسيليا الفقيرة لأيون المنغنيز تحتوي على فجوات عديدة وتفرعات كثيرة، وتحتوي على جدران خلايا متخنة (Vacuolated) فتظهر بشكل منتفخ (الشكل 4.15). توفر قائمة القراءات المرفقة (الجزء 6.15) معلومات مفصلة أكثر عن الأدبيات العلمية المنشورة في هذا المجال.

إن تأثير الأيونات المعدنية الأخرى في تراكم حمض الستريك بـــ Aniger هي أقل وضوحاً مما هي عليه في حالة المنغنيز: أدّعى بعض العاملين بأن هناك تأثيراً قوياً للـــ Fe^{+3} بالذات، ولكن هذا الادعاء لم يدعم من قبل الآخرين.

الرقم الهيدروجيني pH

أشارت التقارير إلى أن تراكم حمض الستريك بكميات كبيرة لا يحدث إلا إذا كان الرقم الهيدروجيني أقل من 2.5. بسبب قيم pK للحمض (6.4،4.7،3.1)، فإن الوصول إلى رقم هيدروجيني قدره 1.8 يكون أوتوماتيكياً عند ترسب كمية معينة منه في الوسط بغياب أي مواد دارئة أخرى. ولهذا فلا توجد أي مشكلة في الوصول إلى هذه النقطة.



الشكل 4.15: الكريّة المايسيليه للفطر Aspergillus niger نامي تحت: (أ) ظروف نقص المنغنيز و (ب) ظروف كافية من المنغنيز (0.1 mmol). قضبان التعليم تشير إلى 50 مايكرومتر في (أ) و 250 مايكرومتر في (ب) (نشر الشكل بموافقة:

M. Roehr, C. P. Kubicek, and J. Kominek. "Further Organic Acids," in: *Biotechnology*, 2nd ed., vol. 6: *Products of Primary Metabolism*, edited by M. Roehr (Weinheim: Verlag Chemie, 1996), pp. 364-379.

علماً أن بعض مصادر الكربون المستعملة (مثل، مولاس البنجر السكري) تحتوي على كميات محسوسة من عدة أحماض أمينية (وبالأخص جلوتاميت) الذي يعمل كدارئ قوي في الوسط محافظاً على رقم هيدروجيني بين 4 و 5. إن سبب الحاجة إلى رقم هيدروجيني منخفض هو منع إنتاج الأحماض الأخرى مثل حمض الجلوكونيك وحمض الأوكزاليك. ويحفز الأنزيم Glucose oxidase بالتراكيز العالية للجلوكوز والتهوية القوية بوجود تركيز منحفض من المغذيات الأخرى، أي بمجمل

الظروف النموذجية لتخمير حمض الستريك، وبهذا فإنه سيتكون حتماً في الطور الأول لتخمر حمض الستريك وسيؤدي إلى تحول كميات مهمة من الجلوكوز إلى حمض الجلوكونيك. علماً، أنه وبسبب موقع الأنزيم خارج الخلية فسيصبح عُرضة للرقم الهيدروجيني الخارجي، وسوف يثبط حال نقصان قيمة الرقم الهيدروجيني إلى أقل من 3.5. كذلك، فإن بعض سلالات *A. niger* تنتج حمض الأوكزاليك عند رقم هيدروجيني قدره 6، الذي يجب تجنبه بسبب سمّيّته. يعود سبب تكون هذا الحمض إلى التحلل المائي للأوكزالوأسيتيت، ولكن إمكانية اشتراك دورة حمض الجلايوكسيليك (Glyoxylic) تحت ظروف معينة لم تستبعد بعد. إن سلالة طافرة من *A.niger*، فاقدة لأنزيمي Glycose oxidase و Oxaloacetate hydrolase، كانت قادرة على إنتاج حمض الستريك عند رقم هيدروجيني قدرة 5، ويكون الإنتاج تحت هذه الظروف كلياً غير حساس لأيونات المنغنيز. علماً أنه في وسط ذي رقم هيدروجيني منخفض، لا تنتج هذه الطفرة أي من حمض الستريك عند إضافة Mn^{+2}، مما يشير إلى أن الحاجة إلى غياب Mn^{+2} يرتبط بظروف خاصة.

هناك توضيح آخر يقترح أن تأثير الـــ pH قد يكون له علاقة بتحولات طاقة (Energetics) التخليق الحيوي للسترات بواسطة *A.niger*، لأن العملية الحصرية لتراكم حمض الستريك (وكما يحدث خلال الطور المنفصل للتخمير) تنتج ATP واحدة وثلاثة NADH التي يتم تحديد تقلّبها (Trunover) بغياب عمليات التخليق الحيوي ذات السعة المماثلة. في حين أنه يمكن إعادة أكسدة جزء من خليط NADH بواسطة مسار بديل هو المسار التنفسي الحساس لحمض ساليسيل هيدروكزاميك (Salicyl Hydroxamic) المشروح أدناه. تُستَهلك ATP، عند pH خارجي منخفض، بواسطة الأنزيم ATPase المرتبط بالغشاء البلازمي، وذلك للحفاظ على تدرج قيمة pH بين السايتوسول والوسط خارج الخلية.

شد الأكسجين المذاب السطحي Dissolved O_2 tension

يعتمد تراكم كميات كبيرة من حمض الستريك على تهوية قوية. وبهذا فإنه من الضروري وجود شد أو توتر أكسجين مذاب أعلى من ذلك المطلوب للنمو النباتي للفطر *A. niger* ونشر متساو لـــ O_2 نقي في الوسط الزرعي لزيادة التهوية. ولقد

أشارت التقارير الحديثة إلى استعمال نواقل الأكسجين مثل 5% (n-Dodecane) لتحسين إنتاج هذا الحمض. من ناحية أخرى، فإن القطع المفاجئ للأكسجين (كما يحدث عند انقطاع التيار الكهربائي) يؤدي إلى ضرر قابل للإصلاح في عملية إنتاج حمض الستريك، ولكن بدون أن يسبب أي ضرر لنمو المايسيليا. يبدو أن القاعدة الكيموحيوية لتوتر أكسجين مذاب عالٍ هي تحفيز مسار تنفسي بديل لعملية إعادة أكسدة NADH المنتج بواسطة الــ Glycolysis. يسمح هذا المسار بتجاوز مواضع حفظ الطاقة، وبهذا فإنه يقلل من منتوج الطاقة من الخلايا. وعوضاً عن بناء الأواصر الكيمياوية للــ ATP، فإن التغيرات في المحتوى الحراري (Enthalpy) الحر خلال عملية نقل الإلكترونات البديلة ينتج منه إطلاق حرارة. وبالنتيجة، فإن إنتاج حمض الستريك يتطلب درجة عالية من التبريد، تشكل جزءاً مهماً من تكاليف الإنتاج. يعتقد أن الوظيفة الفسلجية لهذا التنفس المنفصل هي إزالة المكافئات المختزلة الزائدة بدون الحاجة إلى إنتاج ATP متزامن.

النتروجين Nitrogen

إن مصادر النتروجين المستخدمة في الأوساط الزرعية لإنتاج حمض الستريك تتضمن أملاح الأمونيا، والنتريتات (Nitrates) واليوريا (Urea) . ولا توجد أي دلائل على تفوق أحد هذه المصادر على المصادر الأخرى بشكل أكيد، طالما كان هناك ضمانة أن المركب لا يعمل على زيادة الــ pH.

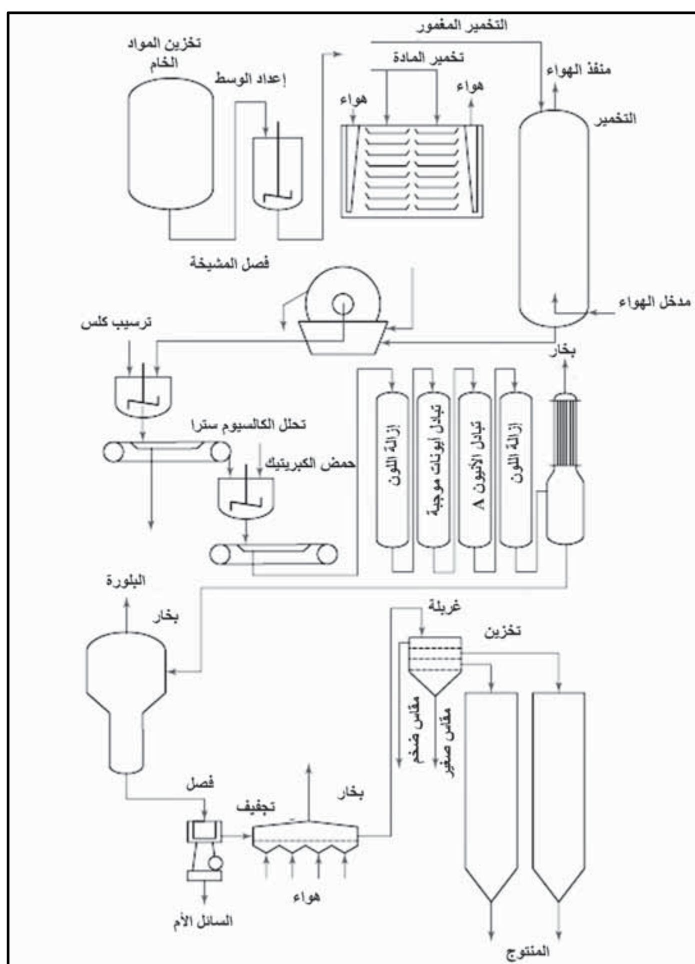
يجب التنويه بأن تأثيرات مصادر النتروجين تلاحظ بصورة رئيسية في الأوساط المعرفة كيميائياً (Defined media)، لأنه لا توجد حاجة إلى مصدر نتروجيني آخر عند استخدام مولاس البنجر كمصدر للكربون. من ناحية أخرى أشار عدد من الباحثين إلى أن الإضافة الخارجية لأيونات الألمنيوم خلال عملية تخمر حمض الستريك تحفز عملية إنتاج السترات.

الفوسفات Phosphate

تتم المحافظة عادة على تركيز منخفض للفوسفات في الأوساط الزرعية. كما يبدو أن التوازن المناسب بين النتروجين والفوسفات والمعادن الضئيلة يكون مهماً لتراكم حمض الستريك في مزارع الدفعة (Batch).

3.2.15 عملية إنتاج حمض الستريك Production process for citric acid

أساساً هناك نوعان مختلفان من عمليات التخمير المستخدمة في إنتاج حمض الستريك، وهما العملية السطحية والعملية المغمورة (انظر الشكل 5.15). إضافة إلى ذلك، فإن هذا الحمض ينتج كذلك، وبالأخص في بعض دول شرق آسيا، بواسطة تخمير الحالة الصلبة (Solid-state fermentation) المسماة عملية كوجي (Koji Process) .



الشكل 5.15: مخطط لعملية تصنيع حمض الستريك بواسطة التخمر السطحي أو المغمور (نشر بموافقة:

M. Roehr, C. P. Kubieek, and J. Kominek, "Industrial Acids and other Small Molecules," in: J. W. Bennet and M.A. Klich, eds., *Aspergilles Biology and Industrial Applications* (Reading, MA: Butterworth – Heineman, 1992), pp. 99-131.

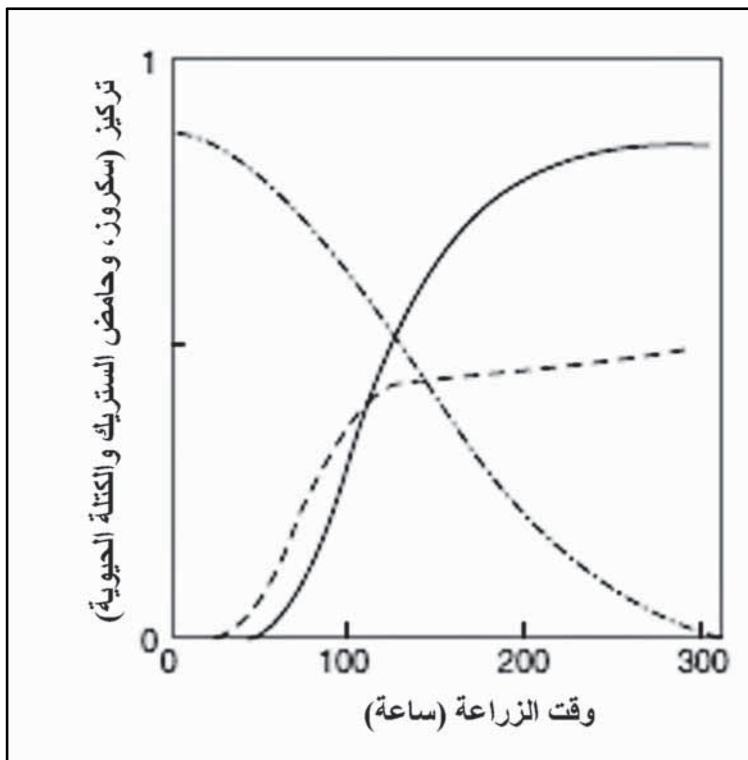
إن عملية نخالة الحنطة اليابانية (Japanese wheat bran process) تشكل حوالى 20% من إنتاج حمض الستريك السنوي في اليابان. وهنالك عمليات مشابهة، تجري باستمرار وبأحجام صغيرة نسبياً، في الصين وجنوب شرق آسيا. تستخدم هذه العملية مواد صلبة ناتجة من معالجات نشاء البطاطا أو نخالة الحنطة، وتثبت قيمة pH إلى 4-5، ومحتوى مائي يبلغ 70-80 %. كما أن إضافة مواد مختلفة مثل α-amylase أو كعكة المرشح الناتجة من تخمر حمض الجلوتاميك أثبتت فائدتها. بعد مرور 5-8 أيام يتم حصاد عملية كوجي ويوضع الناتج في أوعية تقطير (Percolators) ويتم اسخلاص حمض الستريك باستخدام الماء. تجري خطوات التنقية الإضافية باستخدام نفس الطرق المستعملة في التخميرات السطحية أو المغمورة (لاحظ أدناه).

أما التخمير السطحي فهي الطريقة الأقدم، التي تتطلب عملاً كبيراً في تحضير حمض الستريك، ولكنها لا زالت تستخدم إلى حدّ الآن، وحتى من قبل بعض المنتجين الرئيسيين لحمض الستريك. إن السبب الرئيسي في ذلك هو المتطلبات المنخفضة للطاقة، والإنتاجية العالية للعملية، بسبب حساسيتها القليلة لتدخل أيونات المعادن الضئيلة وللاختلافات في قيم شد الأكسجين الذائب السطحي.

تجري عمليات التخمير عادة باستخدام صواني (Trays) معدنية مملوءة بالوسط المغذي إلى عمق يتراوح بين 50 و200 سم. كل صينية تحتوي على حوالى 100 لتر من الوسط. وتوزع الأبواغ (Spores) على أسطح الصواني، مع إمرار هواء معقم (يخدم كمجهز للأكسجين ومساعد في عملية التبريد) فوقها. يتطور المايسيليوم للفطر على شكل لبّاد متماسك، ويصبح أكثر تموجاً مع الزمن. ويتم الحصول على 0.7-0.9 غم/غم من السكر المجهز خلال فترة 7-15 يوم.

إن عملية التخمير المغمور مرغوبة أكثر لأنها ذات كفاءة عالية بسب ملاءمتها لعملية المكننة. ولكن مع ذلك، فإن التأثير الشديد لأيونات المعادن الضئيلة والملوثات الأخرى الموجودة في المواد الكربوهيدراتية الخام، وتأثر العملية بالتغايرات في تجهيز الأكسجين يؤدي إلى صعوبة إدارتها، خاصة حين تكون

نوعية الكربوهيدرات المستعملة متغايرة. وهنالك نوعان من المخمرات المستخدمة في هذه العملية: مخمرات الخزان المخفوق ومخمرات البرج المشبع بالهواء (aerated towers). وكلا النوعين يصنعان باستخدام فولاذ غير قابل للصدأ من الدرجة الممتازة ويحتويان على وسائل تبريد، ويتم نشر الأكسجين من القاعدة.



الشكل 6.15: طبيعة الزمن في عملية تخمير نموذجية لحمض الستريك. يوضح الشكل حمض الستريك وحمض الستريك أحادي الهدرجة (–)، والكتلة الحيوية (..) والسكر (–.–). نموذجياً، يتم الحصول على 8–12 gm/l من الوزن الجاف للكتلة الحيوية و110 – 115 gm/l من حمض الستريك من 140 gm/l سكروز خلال 250-280 ساعة.

إن أحدى أهم صفات التخميرات المغمورة هي تطور المايسليا الذي يظهر نمطاً مميزاً: يكون البوغ النابت خيوطاً (Hyphae) قصيرة ومتفرعة ومنتفخة، تتجمع على شكل كريّات صغيرة (قطر 0.2-0.5) ذات سطح قوي وناعم وتترسب بسرعة أثناء الحصاد (انظر الشكل 4.15). ولقد وجد أن هذا الشكل المتميز يكون

أساسياً للحصول على محصول عالٍ باستخدام التخميرات المغمورة، وأنه يعتمد على التراكيب الغذائية المناسبة. وبهذا فهو مؤشر مناسب لتقدم عملية التخمير (من خلال تحليل الصور الأوتوماتيكي). ويتم الحصول على منتوج نهائي قدره 0.9- 0.8 kg/kg بعد 7 إلى 10 أيام (الشكل 6.15).

ويتم إنتاج حمض الستريك بواسطة الخمائر أيضاً، وذلك باستخدام التخميرات المغمورة حصرياً. ويجري عادة إما باستخدام n-alkanes أو شراب الجلوكوز كمصدر للكربون. إن المادة الأولية المفضلة في هذه العملية هي أجزاء مختلفة من البارافينات (Paraffins) مستقيمة السلسلة (حوالى C_9 إلى C_{20}). أثناء ذلك يجب الحفاظ على قيمة pH فوق 5 ويجب أن تكون نسبة P/C للوسط بين 0.0001 و 0.002. علماً، أن أزمة النفط العالمية التي حدثت في 1974/1973 قد أنهت هذه العملية وبشكل كلي تقريباً لأن السكر أصبح حينها أرخص مصادر الكربون.

تبدأ عملية استخلاص حمض الستريك من العمليات السطحية عادة بعملية ترشيح مرق المزرعة والغسل الجيد لكعكة المايسيليا التي قد تحتجز إلى حد 15% من حمض الستريك المنتج. أما ترشيح المايسيليوم الناتج من العمليات المغمورة فهو بالغالب يتطلب استعمال مساعدات ترشيح نتيجة تكوينات نواتج عرضية بشكل طبقة مخاطية في السكر المتعدد (Polysaccharides) تسلط مقاومة ضد جهد القص المتسبب بواسطة الخافقة. وفي حالات عديدة، تضاف مادة الكلس (Lime) برقم هيدروجيني قدره 3 إلى المرق المغذي لترسيب أي حمض أوكزاليك متواجد.

يتم استخلاص حمض الستريك عموماً بواسطة ثلاث طرق أساسية: (1) الترسيب، (2) الاستخلاص و(3) إدمصاص التبادل الأيوني.

اقترح عدد من الباحثين كذلك طريقة الاستخلاص باستخدام المذيب التي يمكن أن تستعمل أنواع مختلفة من الكحولات الدهنية (Alephatic) أو الكيتونات (Ketones) أو الأمينات (Amines) أو الفوسفينات (Phosphines). من الواضح أن المواد المستخلصة تحتاج إلى عملية تصديق من قبل هيئات الغذاء والدواء المخولة. أخيراً، تجري بلورة حمض الستريك باستخدام مبلورات مفرغة

خالية من الهواء. يتكون حمض الستريك أحادي الماء (Critic acid monohydrate)، وهو المنتوج التجاري الرئيسي في أوروبا عند درجات حرارة أقل من 36 C° في حين يتكون حمض الستريك اللامائي (Anhydride) بدرجات حرارة أعلى.

4.2.15 تطبيقات حمض الستريك Citric acid applications

بسبب طعمه اللذيذ، وسمّيّته المنخفضة وسائغيته الممتازة، فإن حمض الستريك يستعمل صناعياً، وبشكل واسع، في تحضير الغذاء والحلويات (21% من الإنتاج الكلي)، وفي المشروبات (45%). وتتشمل التطبيقات الرئيسية الأخرى الصناعات الصيدلانية وصناعة المنظفات (8% و19% على التوالي). كما أن له القدرة على عمل معقدات مع أيونات المعادن الثقيلة، مثل الحديد والنحاس، وبالتالي فهو يستعمل في تأمين استقرارية الزيوت والدهون أو حمض الأسكوربك (Ascorbic acid) ضد أكسدتها الحفازة بواسطة الأيونات المعدنية، كما أنه مفيد كدارئ على مدى واسع من قيم pH.

بالإضافة إلى ذلك، تتواجد استرات (Esters) حمض الستريك في مدى واسع من الكحولات والتي يمكن استخدامها كلدائن (plasticisers) غير سمّيّة. أخيراً، إن لبعض أملاح حمض الستريك أهمية تجارية، مثلاً قد تستعمل السترات ثلاثية الصوديوم (Trisodium citrate) كمادة حافضة للدم، التي تمنع تخثر الدم من خلال تكوينها لمعقدات مع الكالسيوم، أو يمكن استخدامها كمواد استقرار للمستحلبات (Emulsions) في صناعة الأجبان.

ينتج حمض الستريك اليوم، بكميات كبيرة، حيث يقدر الإنتاج العالمي بـــ 900000 طن سنوياً، وأن معظم هذه الكمية تنتج بواسطة تخمرات الفطر *A. niger*. وتتركز غالبية الإنتاج في أوروبا الغربية (41%)، وأمريكا الشمالية (28%).

3.15 حمض الجلوكونيك Gluconic acid

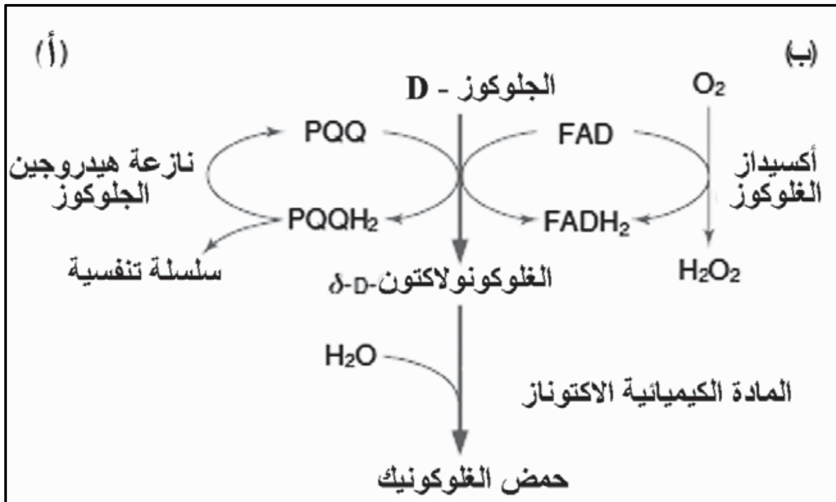
إن مادة D-Glucono – δ Lactone هي أبسط منتوج مباشر لعملية نزع الهيدروجين من السكر D- جلوكوز (Dehydration of D-ghucose)، وشكلها

الحر – حمض الجلوكونيك – ينتج بواسطة أنواع عديدة من البكتريا والفطريات. ويعتمد التوازن بين الـــ Lactone والحمض الحر في المحلول على قيمة pH ودرجة الحرارة.

1.3.15 البيولوجية والكيموحيوية والتقانة الحيوية لعملية تراكم حمض الجلوكونيك

Biology, biochemistry and biotechnology of gluconic acid accumulation

لوحظ تراكم حمض الجلوكونيك من قبل الكائنات المجهرية أولاً في المزارع البكتريا المنتجة لحمض الخليك (Acetic acid)، وفي البكتريا المتطفلة على أشجار الزيتون *Pseudomonas savastanoi*. أما بالنسبة إلى الفطريات، فقد لوحظ تكوين حمض الجلوكونيك بواسطة *A. niger* في عام 1922. بعد ذلك، لوحظ إنتاج هذا الحمض بواسطة أنواع عديدة من الكائنات بدائية النواة وحقيقية النواة المجهرية، مثل الأفراد العائدين لأجناس بكتريا *Pseudomonas*، *Vibrio*، *Penicillium*، و *Gliocladium*.



الشكل 7.15: التفاعلات الأنزيمية المؤدية إلى تكوين حمض الجلوكونيك في (أ) *G. suboxidans* و(ب) *A. niger*.

يتم تكوين حمض الجلوكونيك البكتيري، وبصورة رئيسية بواسطة أنزيم D-glucose dehydrogenase المرتبط بالغشاء، الذي يستعمل PQQ (Pyroloquinline quinine) كأنزيم مساعد (الشكل 7.15–أ)، الذي يعمل على تحويل الجلوكوز خارج الخلية إلى حمض جلوكونيك. يبدو أن الأنزيم الآخر، وهو Glucose dehydrogenase داخل الخلية الذي يعتمد على NADP، لا يلعب دوراً في تراكم حمض الجلوكونيك. وعادة لا يكون حمض الجلوكونيك ناتجاً نهائياً، ولكنه ينتقل عادة إلى داخل الخلية ويخضع إلى عمليات هدمية عن طريق تفاعلات مسار فوسفات البنتوز (Pentose phosphate pathway). مع أن مسار فوسفات البنتوز يكبت بواسطة تراكيز الجلوكوز خارج الخلية التي تزيد على 15 mmol وعلى قيمة pH أقل من 3.5، (الذي يمنع كذلك تكوين مادة 2-Oxogluconate) وبهذا يتراكم حمض الجلوكونيك تحت تأثير هذه الظروف.

تتألف عملية تكوين حمض الجلوكونيك في الفطريات من خطوتين، وتشمل أكسدة β-D-glucose إلى D-Glucono-δ-lactone بواسطة أنزيم Glucose oxidase، ومن ثم التحلل المائي للمادة Lactone لتكوين حمض الجلوكونيك، حيث تتم هذه العملية إمّا تلقائياً أو أنها تحفز بواسطة أنزيم Lactonase. إن أنزيم جلوكوز أوكسيدير هو أنزيم خارج خلوي، مرتبط جزئياً بالجدار الخلوي في أنواع الفطر *Penicllium*، ولكنه يفرز إلى الوسط الزرعي بواسطة أنواع الفطر *Aspergilllus*. إن أنزيم جلوكوز أوكسيديز هو عبارة عن فلافوبروتين مضاف له جلوكوز وهو رباعي السلسلة (Tetrameric, glycosylated flavoprotin)، يستخدم الأكسجين في تفاعله (الشكل 7.15–ب). يحفز هذا الأنزيم بواسطة التراكيز العالية من الجلوكوز والتهوية العالية تحت pH أعلى من 4. وفي الفطر *A.niger* يتم تحفيز الأنزيمات جلوكوز أوكسيريز ولاكتونيز واثنين من أنزيمات الكاتاليز بواسطة H_2O_2 وبطريقة منسقة، ربما تتم بواسطة ناتج الجين المنظم goxB.

تعود الحاجة إلى pH متعادل نسبياً إلى حقيقة كون أنزيم جلوكوز أوكسيديز يثبط عند قيم pH أقل من 3 (انظر الجزء 1.2.15) ولهذا فإنه لا يحفز إلى عدم تكون H_2O_2 في هذه الظروف. من الممكن فسلجياً أن *A.niger* يصنع

جلوكوز أوكسيديز لاستعماله في تفاعلات مضادة ضد كائنات مجهرية أخرى، مما ينتج من ذلك انحسار الجلوكوز وتكوين الهيدروجين بيروكسايد (H_2O_2). ولكي يحمي نفسه من كمية الـــH_2O_2 المرتفع يقوم الفطر *A.niger* بإفراز أشكال مختلفة من أنزيم الكاتاليز كذلك.

2.3.15 عمليات التخمير لإنتاج حمض الجلوكونيك

Fermentation process for production of gluconic acid

طوّرت عدة طرق لإنتاج حمض الجلوكونيك، جميعها تقريباً تستخدم إما *A.niger* أو *Gluconobacter oxidans* ككائنات منتجة. كما وطورت طريقة لإنتاج حمض الجلوكونيك من فطر *A. niger* خلال عقد الثلاثينيات من القرن العشرين، وتجري تقليدياً بواسطة تطبيق عملية جلوكونات الكالسيوم (Calcium gluconate). ولقد نشأ هذا الاسم من استعمال كربونات الكالسيوم في معادلة مرق التخمير، العملية التي بدونها، يعمل الـــ pH المنخفض على تثبيط أنزيم جلوكوز أوكسيديز، وبالتالي منع تراكم حمض الجلوكونيك.

يحتوي وسط الإنتاج على 120–150 غم جلوكوز/لتر (غالباً ما يكون مشتقاً من الذرة). ولا يمكن زيادة تركيز السكر إلى أكثر من ذلك بسبب محدودية قابلية ذوبان جلوكونات الكالسيوم، التي تترسب حينها على المايسيليا وتثبط أخذ الأكسجين والمادة الأولية من قبل الفطر.

المكونات الأخرى للوسط الزرعي، خاصة الأملاح التي تجهز الفوسفور والنايتروجين، تضاف إلى الوسط بكميات محدودة لكي تقيد نمو الفطر. وبالعكس من عملية إنتاج حمض الستريك، فإن تكوين أنزيم جلوكوز أوكسيديز، وبالتالي الإنتاج العالي لتخمير حمض الجلوكونيك يتطلب وجود تركيز عالٍ نسبياً من أيونات المنغنيز. وقد لوحظ أن زيادة ضغط الأكسجين يكون مفيداً، ويمكن فهم ذلك بسهولة عند الأخذ بعين الاعتبار الحسابات الكيميائية الكمية (Stoichiometry) للتفاعل (انظر الشكل 7.15 ب). يمكن إكمال التخميرات ذات المحصول الكمّي (تقابل أكثر من 90% على الأساس المولاري) عادة في أقل من 24 ساعة.

استخدمت عملية جلوكونات الصوديوم كبديل متفوق لعملية جلوكونيت الكالسيوم لأنها تمكن تخمير تراكيز أعلى من الجلوكوز (حتى 350 غم/لتر). في هذه العملية يحتفظ جلوكونات الكالسيوم على درجة حموضة قريبة من 6.5 عن طريق إضافة هيدروكسيد الصوديوم. وفي نواح أخرى، تشابة هذه العملية هي عملية تكوين غلوكونات الكالسيوم التقليدية. استخدمت هذه الطريقة لتطوير عمليات تخمير مستمرة في اليابان، والتي أدعى فيها تحويل محلول سكر بتركيز 35% (وزن/حجم) والحصول على محصول قدره 95%. إضافة إلى ذلك، فقد تمّت الإشارة إلى ذلك في الإنتاج المستمر باستخدام الخميرة المحتملة للضغط التناضحي (Osmotolerant yeast) *Aureobasidium pullulans* التي تتميز بإمكانية وجود تراكيز عالية جداً من الجلوكوز (أكثر ممن 350 غم/لتر) في الوسط.

وصفت عدة عمليات تخمير لحمض الجلوكونك البكتيري، ولكن قليلاً من هذه الطرق استخدمت بالفعل على المستوى الصناعي. وكما أشير سابقاً، إن التركيز العالي للجلوكوز (أكثر من 15% وزن/حجم)، و pH أقل من 3.5 يكون ضرورياً للحصول على منتوج عالٍ. هذا وقد أشار عدة باحثين إلى إمكانية استعمال الخلايا المقيدة الحركة في إنتاج حمض الجلوكونيك.

تتشابه طرق استرجاع المنتوج في التخميرات الفطرية والبكتيرية، ولكنها تعتمد على نوع مصدر الكربون المستخدم وطريقة معادلة المرق.

ترسب مادة جلوكونات الكالسيوم من المحاليل العالية التشبع في درجات حرارة منخفضة، ومن ثم تحرر بإضافة كميات، محسوبة رياضياً، من حمض الكبريتيك. من خلال إعادة هذه الخطوة، يركز السائل الرائق إلى محلول بتركيز 50% (وزن/حجم) من حمض الجلوكونيك. وتترسب مادة جلوكانات الصوديوم عن طريق تركيز المحلول إلى 45% (وزن/حجم) مع رفع قيمة الـــ pH إلى 7.5. إن جلوكونات الصوديوم هي الشكل الرئيسي المصنّع لحمض الجلوكونيك، في الزمن الحاضر، وبهذا فهي تستخدم لتحضير حمض الجلوكونيك الحر ومادة غلونولاكتون δ – Gluconolactone بواسطة طريقة التبادل الأيوني. بما أن حمض الجلوكونيك

واللاكتون Lactone هما في حالة توازن معتمد على الـــ pH، ودرجة الحرارة، فيمكن تحضير أي منهما أو كلاهما بواسطة التعديل المناسب لهذين الظرفين.

3.3.15 التطبيقات التجارية لحمض الجلوكونيك

Commercial applications of gluconic acid

يتصف حمض الجلوكونيك بسمّيّة منخفضة جداً، وقابلية تآكل منخفضة، وقابلية على تكوين معقدات قابلة للذوبان في الماء مع أنواع مختلفة من الأيونات المعدنية ثنائية وثلاثية التكافؤ.

لهذا يكون هذا الحمض مناسباً تماماً لاستعماله في إزالة التكلسات والصدأ من المعادن أو السطوح الأخرى، ومن ضمنها الأوعية المعدنية للحليب سواء كانت مغلونة (Galvanised) أو مصنوعة من الفولاذ الذي لا يصدأ. كما أنه يستخدم، وبسبب خواصة الفسلجية، كإضافات في صناعات الغذاء والمشروبات والمواد الصيدلانية، حيث يكون الناقل المفضل المستخدم في العلاجات بالكالسيوم والحديد. وفي العديد من التطبيقات الغذائية، يكون Lactone – 1.5 أفضل من حمض الجلوكونيك أو الجلوكونات لأنها تمكّن من الوصول إلى الظروف الحمضية تدريجياً خلال فترة Gluconic acid أطول، مثلاً في تحضيرات المخللات، أو في معالجة النقانق الطازجة، أو التخمير في عملية الخبز. كذلك، تستخدم خلائط من الجيلاتين وجلوكونات الصوديوم كمواد للتغرية (Sizing) في الصناعات الورقية. كما تستخدم صناعة المنسوجات مادة الجلوكونات لإزالة التغرية(*) (De-sizing) من أنسجة البوليستر والبولي مايد.

تستخدم الصناعات الأسمنتية مادة جلوكونات الصوديوم بتركيز 0.2-0.02% لإنتاج أسمنت عالي المقاومة للصقيع والتشقق. أما في الصيدلة فإنه يستعمل كأيون مضاد في أملاح الحديد والكالسيوم المستخدمة في علاج النقص من هذه المعادن. وحسب التقديرات الحديثة، يبلغ الإنتاج العالمي لهذه المادة أكثر من 60000 طن سنوياً.

(*) السييز (size) مادة غروية أو دبقة (المترجم).

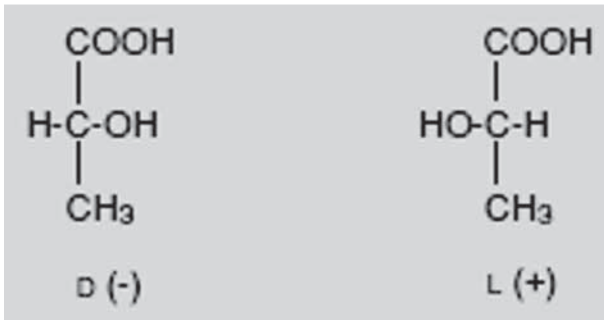
4.15 حمض اللاكتيك Lactic acid

عزل حمض اللبن أو اللاكتيك (الشكل 8.15) لأول مرة من الحليب الحامض في عام 1798 بواسطة العالم Scheele، ووجد لاحقاً أنه يتواجد على شكل نظيرين، L (+) و D (−)، وأنه خليط راسيمي (racemic) منهما. يشير الحرف الكبير قبل الاسم إلى الهيئة الشكلية بالنسبة إلى نظائر الجليسرالدهايد (Glyceraldehyde)، وإن (+) و (−) تشير إلى اتجاه دوران مستوى الضوء المستقطب. يدعى خليط النظيرين، (الراسميت)، D, L-lactic acid (التسمية الكيمياوية الصارمة و الحديثة لهذين النظيرين هي S-lactic acid و R-lactic acid بدلاً من L و D على التوالي. علماً، أن معظم علماء الحياة والعاملين في التقانة الحيوية لازالوا يستعملون نظام التسمية القديم.

1.4.15 الكائنات المنتجة والمسارات الكيموحيوية

Production organisms and biochemical path ways

كان حمض اللاكتيك أول حمض عضوي يصنع بواسطة التخمير (1881, Littletown, Massachusetts, USA). وتتصف بكتريا حمض اللاكتيك بتحملها للحمض، وتكون لاهوائية اختيارياً تقليدياً، كما تصنف هذه البكتريا وظيفياً إلى بكتريا متشكلة التخمر، وبكتريا متجانسة التخمر (Hetero-and Homofermetative Bacteria)، وكل من هذين الشكلين من البكتريا يصنف بدوره حسب أشكاله المكورة أو العصوية.



الشكل 8.15: حمض اللاكتيك D (−) و L (+).

تنتج بكتريا حمض اللاكتيك متجانسة التخمر حمض اللاكتيك، وبشكل حصري تقريباً كناتج نهائي لعملية هدم الجلوكوز، في حين تنتج البكتريا متشكلة التخمر كميات محسوسة من حمض الخليك وحمض الفورميك والإيثانول إلى جانب حمض اللاكتيك. تفتقر معظم سلالات البكتريا متشكلة التخمر إلى فعالية أنزيم Aldolase مما ينتج عنه دفق متزايد من خلال مسار Hexose monophosphate أثناء عملية هدم الجلوكوز (انظر الفصل الثاني). على العكس من ذلك، فإن عملية هدم الجلوكوز في السلالات متجانسة التخمر تجري بواسطة مسار كامل للـ Glycolytic Hexose Biophosphate والتجديد اللاحق للـ NADH المكتسب عن طريق اختزال البيروفيت. ولكن، تحت ظروف النمو التي يكون فيها دفق عملية الـ Glycoysis منخفضاً، فإن سلوك التخمر المتجانس سوف يفقد وستنتج كميات متزايدة من المواد الأيضية الأخرى (انظر أعلاه). نظرياً، يمكن تكوين 2 مول من حمض اللاكتيك من 1 مول هيكسوس (Hexose)، وبهذا نحصل نظرياً على محصول قدره 1kg من حمض اللاكتيك/kg هيكسوس. علماً وبسبب الظروف العملية فإن أعلى محصول ممكن يكون في مدى 90–92%. إن تطبيق تقنيات الوراثة الجزيئية لتحديد صلة القرابة لبكتريا حمض اللاكتيك المرتبطة بالغذاء قد أثمرت عن تغيرات كبيرة في تصنيفها. وإن بكتريا حمض اللاكتيك المرتبطة بالغذاء، تتضمن في الزمن الحاضر أنواعاً عائدة إلى الأجناس *Carnobacterium, Oenococcus, Leuconostoc, Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Weisella, Vagococcus, Tetragenococcus, Streptococcus, Pediococcus.* يبقى جنس *Lactobacillus* متنوعاً، ويحتوي على أكثر من 60 نوعاً، ثلثها متشكل التخمر. تشترك بكتريا حمض اللاكتيك متشكلة التخمر في معظم التخمرات النموذجية التي تقود إلى حفظ الأغذية أو الأعلاف وإلى التحول، في حين تستخدم البكتريا المتجانسة التخمر لإنتاج حمض اللاكتيك بكميات كبيرة.

عموماً، يفضل استخدام السلالات التي تستطيع العمل بدرجات حرارة عالية (45-62 ˚C) لأن من شأن ذلك اختزال الطاقة المطلوبة لتعقيم الوسط. تستخدم

أنواع *Lactobacillus* (مثل L.Delbrueckii) مع الجلوكوز كمصدر كربوني، في حين تستخدم *L.helveticns* و *bulgaricus* في وسط يحتوي على لاكتوز (مصل اللبن). وتستطيع L. delbrueckii spp. Lactis أن تخمر سكر المالتوز، في حين يمكن لـــ *L. amylophilus* أن تخمر حتى النشاء.

معظم الكائنات المجهرية المنتجة لحمض اللاكتيك تنتج نظيراً واحداً لحمض اللاكتيك. علماً، أن بعض البكتريا التي، ولسوء الحظ تتواجد كملوثات في تخمرات حمض اللاكتيك، تحتوي على خليط راسيمي (Rrecemates) وبهذا تكون قادرة على تحويل نظير إلى آخر.

بالإضافة إلى بكتريا حمض اللاكتيك، هناك أحياء مجهرية أخرى قادرة على إنتاجه، مثل *Rhiopus nigricans* و *Bacillus coagulans*. مع العلم، أن هذه الكائنات لا تستخدم للأغراض التجارية.

2.4.15 إنتاج حمض اللاكتيك Lactic acid production

على الرغم من التقدم الكبير في الوراثة الجزيئية لبكتريا حمض اللاكتيك، فإن عملية انتقاء السلالات لازالت تجري باستخدام الطرق التقليدية. إلى جانب صفة الإنتاج العالي لحمض اللاكتيك، يتم انتقاء السلالات الصناعية التي تتصف كذلك بتحملها للحمض ومقاومتها للعاثيات (Phages).

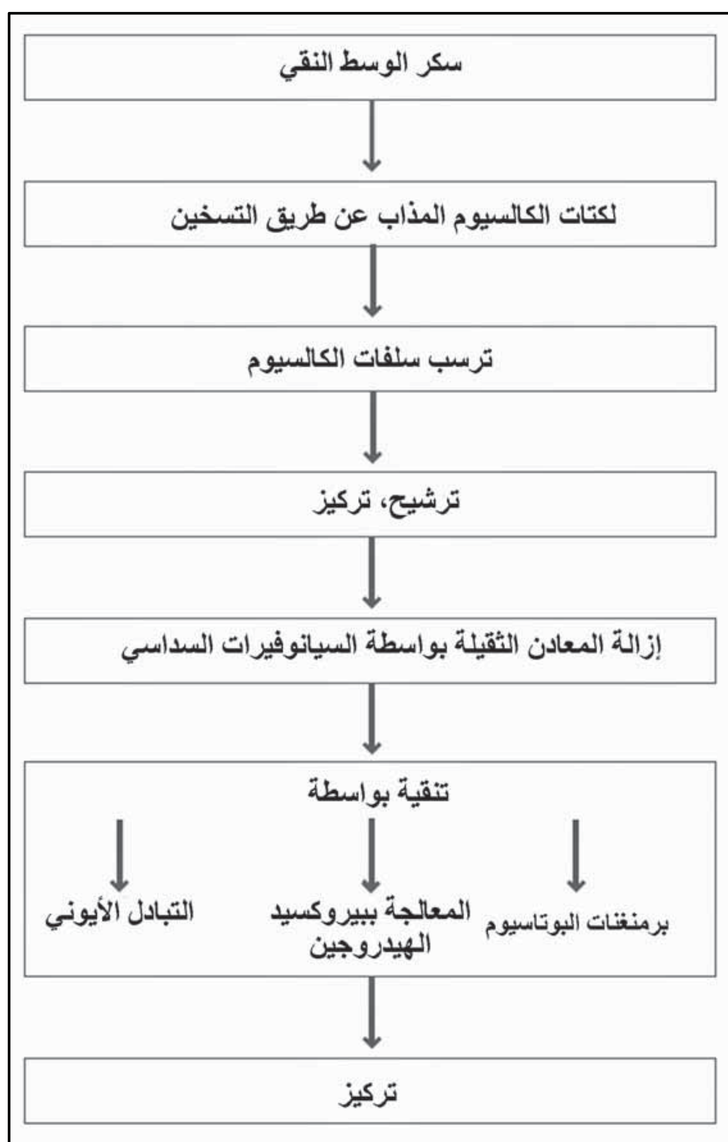
يجب أن ترتقي المواد الخام المستعملة إلى درجة معيّنة من النقاوة، لأن ذلك سيساعد كثيراً في المرحلة النهائية لتنقية حمض اللاكتيك، ولكن هذا يعتمد على نوعية الصنف الذي يراد تصنعيه. وبما أن سعر البيع لحمض اللاكتيك منخفض جداً، فإن الاختيار المناسب لمصدر الكربون ذو أهمية كبيرة، وإن المواد التي تستخدم باستمرار تشمل شراب الجلوكوز (مثلاً، المشتق من التحلل المائي للنشاء) أو المواد المحتوية على سكر المالتوز أو السكروز (من المولاس مثلاً) أو اللاكتوز (مصل اللبن). ينتج حمض اللاكتيك تقليدياً على شكل أملاح كالسيوم. ومعظم طرق التخمير التي تجري اليوم هي تحويرات بسيطة للطرق التي طورت في بداية عقد الخمسينيات من القرن العشرين. تجري هذه التخميرات في مفاعلات تصل أحجامها إلى $100\ m^3$ وباستخدام

مصدر كربوني بين 120 و 180 غم/لتر تحصل على تراكيز مناسبة من الأملاح المحتوية على النتروجين والفوسفات والمغذيات المجهرية. وبما أن بكتريا حمض اللاكتيك تظهر متطلبات غذائية معقدة لفيتامينات B وبعض الأحماض الأمينية، فيجب إضافة مواد داعمة مناسبة (مواد نباتية خام، مثل بادئات الشعير). وتجري عملية التخمير في درجة حرارة 45 °C مع خلط خفيف (بكتريا حمض اللاكتيك هي بكتريا لاهوائية، ولهذا يجب إدخال الأكسجين). يحافظ على قيمة الـ pH ما بين 5.5 و 60 عن طريق إضافة كربونات الكالسيوم المعقم. كبديل لمعادلة كربونات الكالسيوم يمكن استعمال الأمونيا التي تساعد، كذلك في استرجاع حمض اللاكتيك عن طريق الأسترة (Esterification) (انظر أدناه). ولكن العملية في هذه الحالة تكون أكثر كلفة. بسبب خصائص حمض اللاكتيك في إحداث التآكل، فقد استخدم الخشب أو الأسمنت في الماضي في بناء المخمرات. أما في الزمن الحاضر فيستخدم الفولاذ الذي لا يصدأ في معظم الحالات، خصوصاً في حالات إنتاج أحجام كبيرة. ويتم عادة الحصول على تحول بنسبة 85% - 95% من الحد الأقصى النظري بعد 4–6 أيام.

وصفت في المنشورات البحثية طرق إنتاج تعتمد على المزارع المستمرة أو الخلايا مقيدة الحركة، ولكنها لم تطبّق في الصناعة إلى حدّ الآن.

وطورت تقنيات عديدة لتنقية حمض اللاكتيك، وتلك ضرورية لتحقيق متطلبات النقاوة المختلفة. إنه من الضروري جداً اختزال تركيز السكر المتبقي إلى أقل من 0.1% (وزن/حجم) عندما يكون الهدف الحصول على حمض لاكتيك عالي النقاوة. يوضح الشكل (9.15) الطريقة القياسية لاسترجاع الحمض من وسط غذائي نقي. أما المرق المستحصل من تخمير مواد خام ذات نوعية منحفضة فتحتاج إلى خطوات تنقية عديدة، ومن ضمنها التنقية بواسطة ترشيح محلول لاكتيت الكالسيوم الساخن، ومن ثم إعادة بلورته لعدة مرات.

البدائل التي يمكن استخدامها تشمل الاستخلاص باستخدام المذيب (مثلاً استخدام Isopropyl ether أو Butanol– 2 أو Triakly Tertiary Amines في مذيبات عضوية)، أو بإجراء عملية الأسترة (Esterification) باستخدام الميثانول، ثم إتباعها بعملية التقطير.



الشكل 9.15: مخطط لاسترجاع حمض اللاكتيك من مرق التخمر.

3.4.15 التطبيقات Applications

حمض اللاكتيك سائل كثيف القوام، يمتص الرطوبة بسرعة (Hydroscopic) ويتوفر تقنياً بعدة درجات أو أصناف (Grades)، مثل الصنف التقني، أو الصنف الغذائي، أو الصنف الصيدلاني والصنف البلاستيكي. خصائص

هذه الأصناف وتطبيقاتها موضحة بالجدول 15-4. التقديرات الحديثة لحجم سوق حمض اللاكتيك هي حوالى 50000 طن سنوياً، ينتج 70% منها بواسطة التخمير والباقي من خلال التصنيع الكيميائي.

الجدول 4.15: الأصناف التجارية لحمض اللاكتيك واستخداماتها

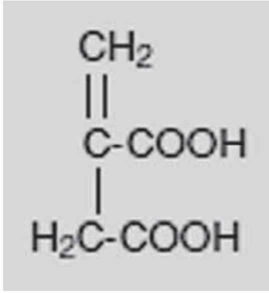
النوعية	الصفة	تطبيق
الصنف التقني	ذو لون بني فاتح 20–80% حمض لاكتيك خالي من الحديد	صناعة لأنسجة والأيستر
الصنف الغذائي	عديم اللون والرائحة أكثر من 80% حمض لاكتيك	إضافات غذائية، إنتاج الطحين الحمض والعجين الحمض
الصنف الصيدلاني	عديم اللون والرائحة أكثر من 90% حمض لاكتيك أقل من 0.1% رماد	معالجة الأمعاء، تحضيرات طبية.
الصنف البلاستيكي	عديم اللون أقل من 0.01% رماد	اللكير (Lacquer)، الورنيش والبوليمرات القابلة للتكسير الحيوي

5.15 الأحماض الأخرى Other acids

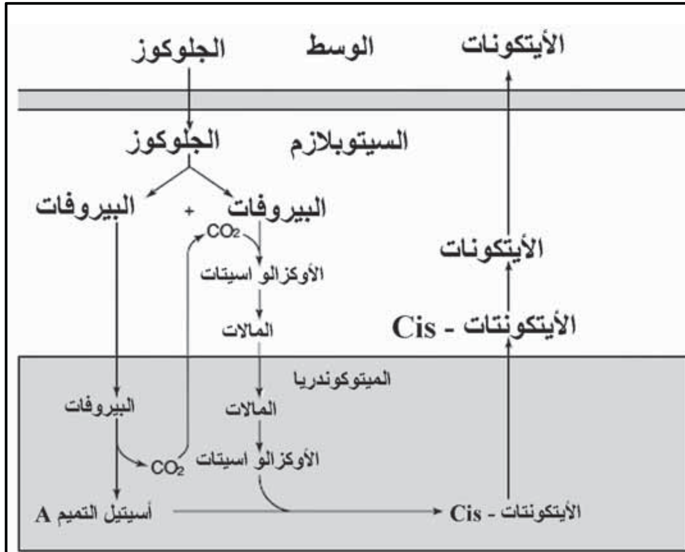
بالإضافة إلى حمض الستريك وحمض الجلوكونيك، وحمض اللاكتيك يوجد عدد من الأحماض الأخرى التي تنتج صناعياً، ولكن بكميات أقل.

1.5.15 حمض الايتاكونيك Itaconic acid

عرف هذا الحمض أصلاً كمنتوج لعملية تقطير حمض الستريك. وفي عقد الأربعينيات من القرن العشرين، وجد أن بالإمكان إنتاجه بواسطة التخمير باستعمال *Aspergillus terreus*. من الناحية الكيميائية، فإن حمض الأيتاكونيك هو بديل تركيبي لحمض Methacrylic. وبسبب سمّيّته القليلة، فإنه يستعمل بشكل رئيسي في صناعة البوليمرات المساعدة من نوع ستايرين بيوتادين (Styrene Butadiene Co-Polymers)، ولكنه يجب أن يتنافس مع منتوجات مشابهة منتجة بواسطة الصناعات البتروكيميائية والتي تكون أرخص سعراً، و لكنها ليست بنفس الكفاءة في إنتاج البوليمر الصحيح.



الشكل 10.15: حمض الأيتاكونيك مُحضر بواسطة عملية التخمير المغمور باستخدام سلالات من *A. terreus* أو *A. itaconicus* يتكون هذا الحمض كيميائياً بواسطة تفاعلات مشابهة لتلك المشتركة في عملية تراكم حمض الستريك، أي، عمليات أيض هدمية للكربون من خلال مسار الــ Glycolysis والتكوين المكمل لمادة أوكزالو أسيتيت بواسطة تثبيت CO_2 (الشكل 11.15). إضافة إلى ذلك – وعلى العكس من *A. niger* فإن *A-terreus* تحتوي على أنزيم إضافي هو Aconitate decarboxylase، والذي يكوّن مادة itaconate من Cis-Aconitase. وبما أن هذا التفاعل يتمركز في السايتوسول، ولأن أنزيمات Citrate synthase وaconitase تتمركز في المايتوكوندريا، فقد اعتقد أن *A.terreus* تنقل Cis-acontitiate وليس السترات لتبادله مع الماليت خارج الميايتوكوندريا (الشكل 11.15). ربما يحتوي *A. terreus* على بروتين ناقل، مشابهاً لمصدر السترات المفترض وجوده في *A. niger*، قادر على إفراز حمض الأيتاكونيك. خلال عملية التخمير. ويرافق تكوين حمض الأيتاكونيك تكوين كميات مختلفة من أحماض Succinic وCitramalic و Itatartaric. تشير المعلومات المتوفرة حالياً، إلا أن هذه الأحماض ليست ناتجة من تكسير حمض الايتاكونيك، ولكنها تتكون بواسطة مسارات أخرى.



الشكل 11.15: مخطط أيضي مبسط للتخليق الحيوي لحمض الأيتاكونيك. تم حذف التفاعلات الجانبية والمواد الوسطية التي ليس لها علاقة بالتخليق الحيوي لحمض الايتاكونيك.

إن الإنتاج التخميري لحمض الأيتاكونيك يشابه عموماً إنتاج حمض الستريك، أي أنه يتطلب وجودَ كمياتٍ زائدة من مصادر الكربون سهلة الأيض

(شراب الجلوكوز، متحللات النشا الخام، المولاس)، وشداً سطحياً عالياً للأكسجين الذائب، ومحدودية في الأيونات المعدنية من خلال تكون معقدات و/أو الترسيب بواسطة مادة Ferric hexacyanoferate (البروسي الأزرق– Prussian Blue) أو بواسطة إضافة النحاس (انظر الجزء 2.2.15). يُقيد النمو عادة بواسطة تحديد الفوسفات المتوفرة. علماً، أنه لا تتوفر معلومات على تأثير Mn+2 . وتأثير الــ pH هو كذلك مختلف : باحثون عدة قالوا إن الـــ pH يجب أن يحفظ ما بين 2.8 و 3.1 ، وأن قيمة الــ pH المنخفضة تساعد على تكوين الناتج العرضي itatartaric acid. تم تسجيل محصول قدره 85% (وزن / وزن) من الحد الأقصى النظري خلال فترة خمسة أيام بعد الزرع (Cultivation) تحت درجات حرارة عالية (39 – 42 °C). وكما أشير إلى محاولات واعدة لإنتاج حمض الايتاكونيك بواسطة الكتلة الحيوية مقيدة الحركة.

تتم عملية الاسترجاع عادة بواسطة التبخر المعاملة بالكربون النشط ومن ثم البلورة/ إعادة البلورة. يباع حمض الايتاكونيك بصنفين:الأول مصفى، يكون على شكل بلورات ذات لون أسمر شاحب إلى أبيض، أما الثاني، فهو الصنف التجاري وذو لون أغمق.

الاستخدام الرئيسي لحمض الايتاكونيك يكون في صناعة بوليمرات ستايرين بيوتادين المساعدة وفي مستحلبات المشبكات والأصباغ لتحسين خاصية التصاق البوليمر. وبسبب مجاميعها الحمضية فإن البوليمرات المتشكلة الناتجة تكون ذات خصائص مخصبة للماء.

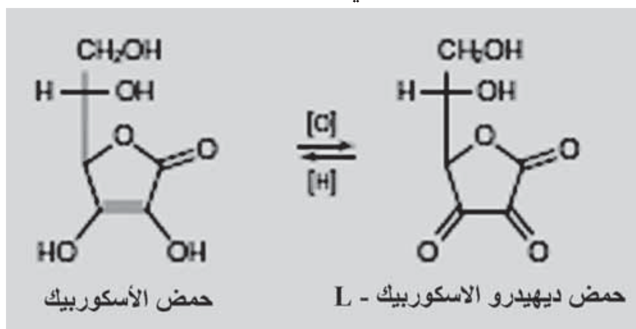
يضاف حمض الايتاكونيك كذلك وبكميات قليلة (أقل من 2%) في عمليات التغطية بكلوريد الفينيليدين (Vinylidene Chloride Coatings) حيث يؤدي ذلك إلى تحسين خواص الالتصاق على الورق والسيلوفين وأغشية PolyC Ethylene terephathalate في عمليات التعليب والتصوير.

يبلغ الحجم الكلي للسوق حوالى 15000 طن سنوياً. في حين أن هناك حاجة كبيرة إلى استبدال الأكرايليك أو حمض ميثاكريليك في البوليمرات، وهناك

إمكانية لنمو سوق حمض الأيتاكونيك، فإن التوسع في هذا السوق يكون ممكناً فقط من خلال خفض تكاليف الإنتاج، حيث إن السعر الحالي هو 4 دولار أمريكي/كغم تقريباً.

2.5.15 حمض الاسكوربيك (فيتامين C) L-ascorbic acid

L- Ascorbic acid حمض الأسكوربيك هو الاسم الرسمي الذي أطلقته IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemicals) على فيتامين C. اكتشف هذا الحمض كمستخلص من الفلفل في عام 1928 بواسطة Szent – Gyorgyi. وأكثر صفاته أهمية هي الأكسدة القابلة للعكس Reversible oxidation) لحمض dehydro-l-ascorbic (الشكل 12.15)، الذي بواسطتها يستطيع تكوين نظام الريدوكس (Redox system). يُحفز عدد من الأنزيمات بواسطة حمض الأسكوربيك، وبالأخص أنزيمات Dioxygenases الحاوية على الحديد وأنزيمات الـــ monoxygenases الحاوية على النحاس. إن أحد أفضل الأمثلة لأغراض نقص حمض الأسكوربيك هو داء الأسقربوط (Scurvy) الذي يمكن توضيح سببه بعدم فعالية هذه الأنزيمات المؤكسدة (Oxidases) المطلوبة في عملية التخليق الحيوي للكولاجين. علماً، أن حمض الأسكوربيك يعمل كذلك على حماية الجسم ضد تكون مواد النايتروسوأمين (Nitrosamines) وجذور الأكسجين (Oxygen radicals) السرطانية، كما أن له وظيفة أساسية في عملية أخذ الحديد. إن هذه الصفات، بالاشتراك مع صفاته الغذائية الجيدة. وسمّيّته المنخفضة، هي السبب الرئيسي للتطبيقات العديدة لفيتامين C في الصناعات الغذاية والصيدلانية.



الشكل 12.15: حمض الأسكوربيك في حالة توازن مع حمض Dehydro-L-Ascorbic [O]. تعني أكسدة، [H] تعني اختزال.

تجارياً، ينتج حمض الاسكوربيك بارتباط خمس خطوات كيميائية عضوية صناعية وخطوة تحول حيوي واحدة، بعملية تعرف بمجموعها، تخليق رايشيستاين (Reichstein Synthesis). المبدأ الأساس في هذه العملية هو اختزال C-1 للــ D – جلوكوز، وأكسدة C-5 و C-6، في حين تحافظ بنفس الزمن على الخصائص الهندسية (Chirality) لــC-2 و C-3. المخطط التقليدي موضح بالشكل (13.15). إن الخطوة الحفازة بواسطة الكائن المجهري هي أكسدة D – سوربيتول إلى L – سوربوز التي تقوم بها البكتريا *Acetobacter xylinum*. تجري التخمرات على المستوى الموسع تحت درجة حرارة 30 – 35 ^oC و pH 4 - 6. والخطوات الست لعملية تخليق رايشيستاين تنتج عموماً أكثر من 90%، وبهذا فإن المحصول النهائي لحمض الاسكوربيك يكون حوالى 60%. تبلغ تقديرات الإنتاج الصناعي الحالي حوالى 80000 طن سنوياً، وتبلغ قيمة السوق العالمي 600 مليون دولار أميركي ومعدل نمو سنوي قدره 3-4%. وإن جزءاً كبيراً من هذه الكمية ينتج كحمض أسكوربيك حرّ.

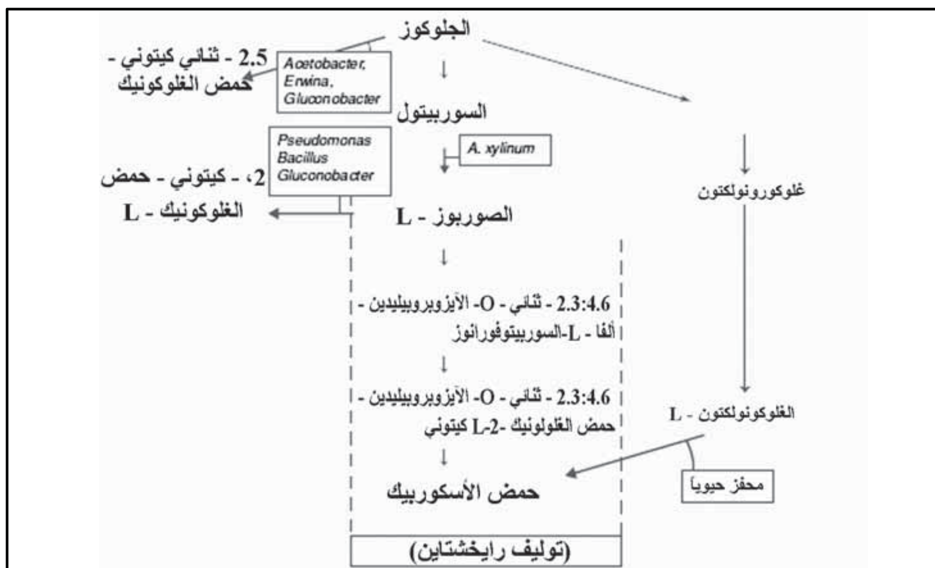
أُجريت محاولات لإنتاج حمض الأسكوربيك مباشرة بواسطة التخمير ولكن، وإلى حدّ الآن، لم تصل أيٌّ من هذه المحاولات إلى درجة العمليات الصناعية. تتمكن الطحالب المجهرية العائدة إلى جنس *Chlorella* من تكوين حمض الأسكوربيك – L من D – جلوكوز مباشرة، ولكن بكميات قليلة جداً. فالكتلة الحيوية لهذه الطحالب الغنية بحمض الأسكوربيك تستخدم حالياً كعلف أو إضافة علفية للأسماك.

نتيجة لذلك، وبالرغم من استهلاكها للطاقة، وحاجتها إلى درجات حرارة وضغط عاليين للعديد من الخطوات، واستخدامها لكميات كبيرة من المذيبات العضوية واللاعضوية، والكلفة العالية للتخلص من الفضلات الناتجة، فإنه وإلى حدّ الآن لا توجد طريقة بديلة لطريقة تخليق ريشيستاين؛ علماً، أن هناك عدة محاولات لاختزال عدد خطوات تخليق المواد الكيميائية العضوية من خلال استخدام مواد أولية أكثر ملائمة منتجة بواسطة الكائنات المجهرية. إن أكثر هذه المحاولات نجاحاً موضحة بالشكل (13.15): أحد الاحتمالات هو إنتاج حمض 2-Keto L-gulonic من -L Sorbose بوساطة التخمير باستخدام *Bascillus megaterium* أو *Psudogluuconobacter saccharoketogenes*. فالمحاصيل هي ما بين 90-

75% ولذلك ستوفر، عندما تتم عملية التوسع، طريقة إنتاج أرخص لحمض الأسكوربيك.

الجدول 5.15: الأحماض العضوية الأخرى التى يمكن إنتاجها بواسطة الأحياء المجهرية.

الحمض	المنتج	التطبيقات الممكنة
حمض التارتاريك	*Gluconobacter Oxydans*	المشروبات، الأدوية
حمض الفيوماريك	*Rhizopus nigricans*	صناعة البوليستر
	R.arrhizus	صناعة L– أسبارتات
حمض الماليك	*Aspergillus wentii*	المشروبات، النكهة
حمض أنواع – trans-2-3 Epoxysuccinic	*Paecilomyces*	مادة مولدة لمادة B- Lactom
	A.fumigatus	
	A.clavatus	
حمض سكسينيك	*A.niger*	
حمض كوجيك	*A.oryzae*	مواد تجميل، مبيدات حشرية
حمض جاليك	*A.wentii*	صبغات زرقاء



الشكل 13.15: مسار نصف صناعي لحمض الأسكوربيك (L) تشير الأسهم الغامقة إلى الخطوات التي يمكن إجراؤها بواسطة التخمير أو بواسطة التحفيز الحيوي. الكائنات المجهرية المعنية موجودة داخل الصناديق.

إن نظام التحفيز الحيوي المستمر يعتبر نظاماً واعداً لتخليق المواد الوسطية لعملية رايشستاين، ويعتمد هذا النظام على تحويل الجلوكوز أولاً إلى جلوكونيت بواسطة أنزيم Glucose dehydrogenase يعتمد على NADP معزول من Thermoplasma. يتم التحويل اللاحق إلى 2،5 - Diketo -D-gluconate بواسطة 2،5 - Diketo -D-gluconate dehydrogenase المرتبط بالغشاء والعامل المساعد Cytochrome C. أخيراً يتحول 2،5 - Diketo -D-gluconate إلى 2،5 - keto -L-gluconate بواسطة 2،5 – Diketo – D – Gluconate Reductase مع تجديد إنتاج NADP+ بواسطة Gluconate dehydrogenase.

المسار الآخر، القصير جداً والحفاز حيوياً، لتخليق حمض الأسكوربيك يكون ممكناً عن طريق L-gulonolactone التي يمكن تحويلها مباشرة إلى حمض الأسكوربيك بواسطة أنزيم L-gulonolactone dehydrogenase في حين يمكن الحصول على l-gulonolactone بسهولة بواسطة الإضافة الكيمياوية للهيدروجين إلى D-glucuronolactone، إلا أن هذه المادة الأخيرة تستحصل من الجلوكوز أو النشاء بكميات قليلة فقط.

3.5.15 الأحماض الأخرى Other acids

يمكن إنتاج عدد من الأحماض الأخرى، التي لها علاقة بدورة حمض Tricarboxylic acid، بصورة تجارية وبكميات جيدة. علماً، أن إنتاج إحدى هذه الأحماض لم يصل إلى المستوى الصناعي بعد. بعض هذه الأحماض موضحة بالجدول (5.15). مثل حمض الفيوماريك، كان قد تم إنتاجه في الماضي على المستوى الصناعي بواسطة التخمير، ولكن مثل هذا الإنتاج لم يتمكن من منافسة الإنتاج الكيميائي الحالي.

Further reading 6.15 قراءات إضافية

Cocain-Bousquet, M., S. Even, N. D. Lindley, and P. Loubiere, "Anaerobic Sugar Catabolism in Lactococcus Lactis: Genetic Regulation and Enzyme Control over Pathway Flux." *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 60 (2002), pp. 24-32.

R. D. Hancock and R. Viola, "Biotechnological Approaches for l-ascorbic Acid Production," *Trends in Biotechnology,* vol. 20 (2002), pp. 299-305.

Karaffa, L. and C. P. Kubicek, "Aspergillus Niger Citric Acid Accumulation: Do We Understand This Well-Working Black Box?," *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 61 (2003), pp.189-196.

Kascak, K., J. Kominek, and M. Roehr, "Lactic Acid." in: *Biotechnology*, 2nd ed. Vol. 6, *Products of Primary Metabolism*, edited by M. Roehr (Weinheim: Verlag Chemie, 1996), pp. 294-306.

Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek, "Citric Acid." in: *Biotechnology*, 2nd ed. Vol. 6, *Products of Primary Metabolism*, edited by M. Roehr (Weinheim: Verlag Chemie, 1996), pp. 308-345.

Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek, "Further Organic Acids," in: *Biotechnology*, 2nd ed. Vol. 6, *Products of Primary Metabolism*, edited by M. Roehr (Weinheim: Verlag Chemie, 1996), pp. 364-379.

Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek, "Gluconic Acid." in: *Biotechnology*, 2nd ed. Vol. 6, *Products of Primary Metabolism*, edited by M. Roehr (Weinheim: Verlag Chemie, 1996), pp. 347-362.

Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek, "Industrial Acids and other small Molecules," in: J. W. Bennett and M. A. Klich, eds., *Aspergillus: Biology and Industrial Applications* (Reading, MA: Butterworth-Heinemann, 1992), pp. 91-131.

Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel, "Lactic Acid Bacteria in Food and their Current Taxonomy," *International Journal of Food Microbiology,* vol. 36 (1997), pp. 1-29.

Willke, T. and K. D. Vorlop, "Biotechnological Production of Itaconic Acid," *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 56 (2001), pp. 289-295.

الفصل السادس عشر

السكريات المتعددة الجرثومية وزيوت الخلية المفردة

Microbial Polysaccharides and Single Cell Oils

James P. Wynn

Martek Biosciences Corp. USA

جيمس وين

شركة مارتيك للعلوم الحيوية، الولايات المتحدة الأمريكية

Alistair J. Anderson

University of Hull, UK

أليستير أنديرسون

جامعة هال، المملكة المتحدة

1.16 المقدمة Introduction

عندما تزود الكائنات المجهرية بكميات زائدة من الجلوكوز، أو بمصدر كربوني آخر، وبالطاقة، فإنها تعمل على إنتاج واحد أو أكثر من مركبات الخزن داخل الخلية يكون قابلاً للاستعمال من قبل الكائن المجهري في حالة مواجهته لظروف انعدام المصدر الكربوني، أي في حال التجويع (Starvation).

تعتمد بعض أنواع الخمائر والفطريات والطحالب المجهرية على مراكمة كميات كبيرة من الزيوت أو الدهون. أما بالنسبة إلى البكتريا فهي غالباً ما تعمل على مراكمة البوليمر المعروف بـــ Polyhydroxyalkanoate (PHA). ويمكن

رؤية كلا النوعين من مركبات الخزن تحت المجهر، كأجسام ضمنية مميزة داخل الخلايا. يبلغ تركيز هذه الأجسام المخزونة إلى 70% أو أكثر من الوزن الجاف للخلية في أنواع معينة. إن مادة الجلايكوجين (Glycogene) (أحد بوليمرات الجلوكوز ويطلق عليه أحياناً اسم نشا البكتريا) والتريهالوز Trehalose (سكر ثنائي) هي أمثلة أخرى معروفة لمركبات الخزن الجرثومية. وبدلاً من إنتاج PHA أو الدهون، تقوم بعض الكائنات المجهرية أحياناً بتخليق كميات كبيرة من السكريات المتعددة (Polysaccharides). وغالباً ما تكون الكميات المنتجة كبيرة جداً بحيث تفرز إلى خارج الخلية، وبهذا تكون، وعلى العكس من مركبات الخزن الأخرى، خارج الخلية (Extracellular).

يُحفّز تخليق جميع هذه المنتوجات عندما يقيد النمو بتوفر مادة غذائية أساسية غير الكربون. وعادة ما يُختار النتروجين كمادة غذائية مُحدِدَة. وبهذا فعند نفاذ النتروجين تستمر الخلايا بتمثيل مصدر الكربون ولكن، وبسبب توقف النمو، لأن النتروجين ضروري لتخليق البروتين والأحماض النووية، فهذا الكربون الداخل سيوجه نحو مركبات الخزن. إن نوع مركب الخزن المتكون يعتمد، طبعاً، وبصورة كلية على التركيب الوراثي للكائن.

ركزنا في هذا الفصل على منتوجات الخزن الجرثومية ذات القيمة التجارية. وهذا يعني، أننا وبخلاف ما هو موجود في فصلنا المنشور في الطبعة الثانية من هذا الكتاب، سوف لا نغطي إنتاج مواد Polyhydroxyalkanoates لأن الاهتمام التجاري بهذه المواد قد تضاءل كثيراً. علماً أن السكريات المتعددة والزيوت لا زالت مواد مهمة في التقانة الحيوية.

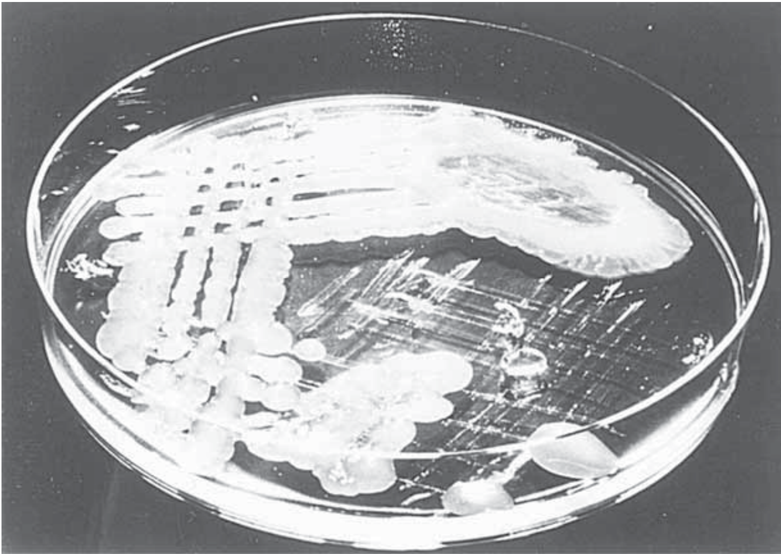
2.16 السكريات المتعددة الجرثومية Microbial polysaccharides

1.2.16 المقدمة Introduction

الكثير من الكائنات المجهرية تنتج كميات محسوسة من السكريات المتعددة عند توفر كميات زائدة من مصدر الكربون. ويتراكم بعض من هذه السكريات

المتعددة في الخلية، وتعمل كمركبات خزن، حيث إن الجلايكوجين هو خير مثال على ذلك. والسكريات المتعددة الأخرى المعروفة بالسكريات المتعددة الخارجية Exopolysaccharides (EPS)، تفرز بواسطة الخلايا وهي عادة السكريات المتعددة الجرثومية ذات الأهمية التجارية. وقد تبقى هذه السكريات مرتبطة بالخلايا على شكل كبسولة أو مادة مخاطية لزجة، أو أنها قد تذوب في الوسط. يعتمد هذا على عدة عوامل مثل التركيب الكيميائي للسكر المتعدد، وعلى مدى شدة هزّ الزرعة. وعلى الأوساط الصلبة، وقد تنتج مستعمرات كبيرة لزجة (الشكل 1.16).

في حين أن بعض السكريات المتعددة الخارجية الجرثومية، التي تعرف عموماً في الصناعة بالأصماغ (Gums)، هي منتجات تجارية معروفة، إلّا أنها يجب أن تتنافس مع السكريات المتعددة النباتية، والتي يصنع قسم منها بكميات كبيرة جداً وبسعر منخفض. يمكن الاستمرار بإنتاج السكريات النباتية، وإذا تمّت السيطرة الجيدة على عملية التخمير سيكون بالإمكان الحصول على منتوج دائم جيد يمكن الاعتماد عليه. علماً، أن التخمير هي عملية مكلفة نسبياً، وهي غير ملائمة لصناعة المنتوجات الرخيصة حتى ولو كان ذلك بأحجام كبيرة.



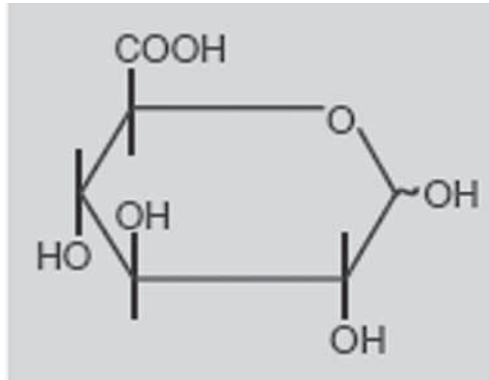
الشكل 1.16: سلالة *Pseudomonas mendocina* المنتجة لمادة الألجينيت (Alginate) نامية على الأجار (Agar).

2.2.16 الصفات العامة General properties

إن السكريات المتعددة الجرثومية، مثلها في ذلك مثل السكريات المتعددة للنباتات والأعشاب البحرية (Seaweeds)، هي ذات قيمة بسبب إمكانية استعمالها في تحوير خصائص السريان للمحاليل (Rheology). إنها تعمل على زيادة اللزوجة وتستخدم عادة في مواد التثخين، والهلام والتعليق.

إن بعض السكريات المتعددة مثل الديكستران والسكليروجلوكان (Scleroglucan) متعادلة وخالية من المجاميع القابلة للتأين. أما الأنواع الأخرى، مثل الزانتان والجيلان، فهي حمضية. إن السكريات متعددة الحمضية، والتي لها قيمة تجارية أكبر، هي من نوع الالكتروليتات المتعددة (Polyelectrolytes)، وهي تحتوي على مجاميع كربوكسيل من أحماض اليورونيك (Uronic acids)، مثل حمض Glucuronic acid (الشكل 2.16) وعلى/ أو مجاميع بيروفيت.

يتأثر شكل جزيئات السكريات المتعددة في المحلول بالقوة الأيونية (تركيز الملح)، وبالرقم الهيدروجيني، وبتركيز السكر المتعدد. وتتأثر السكريات متعددة الحمضية عموماً بشكل أكبر بوجود الأيونات الموجبة (Cations) في المحلول. يمكن للأيونات الموجبة الثنائية أن تربط سلاسل السكريات المتعددة مع بعضها بعضاً لإنتاج هلام قوي.

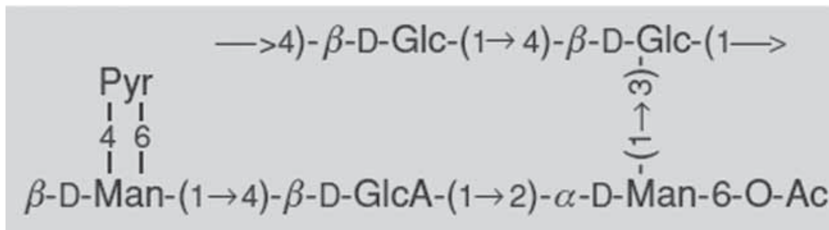


الشكل 2.16 تركيبة حمض الغلوكورونيك، وهي موجودة عادة في السكريات المتعددة الخارجية (exopolysaccharides) الجرثومية.

3.2.16 الزانتان Xanthan

ينتج الزانتان بواسطة البكتريا السالبة لصبغة جرام *Xanthomonas*. إن الزانتان هو أكثر السكريات المتعددة الخارجية استعمالاً وأكثرها مدروساً. والزانتان هو بوليمر كبير ذو وزن جزيئي يزيد على 10^6 دالتون. إنه بوليمر متفرع يحتوي على عمود فقري من الجلوكان (Glucan) مرتبط على شكل $(1\rightarrow4)$ - β (أي بوليمر من الجلوكوز) وترتبط به سلسلة جانبية مكونة من سكر ثلاثي، مع جزيئات السكر المتعاقبة في العمود الفقري (الشكل 3.16). يعتمد محتوى البيروفيت والأسيتيت على سلالة البكتريا وعلى ظروف الزرع ومعاملة البوليمر. وليس لهذه المواد تأثير كبير في خصائص البوليمر.

يعتبر الزانتان اليكتروليت متعدداً لوجود جزيئات حمض Glucuronic في سلاسله الجانبية. بالرغم من كونه سكراً متعدداً حمضياً، إلّا أن لزوجته مستقلة، نسبياً، عن تركيز الملح.



الشكل 3.16 تركيبة الزنتان. مدى أستلة الوحدة مانوز المتاخمة للعمود الفقري هي عادة 30 %، لكن يمكن أن تكون أقل من ذلك بكثير، أو ما يفوقها.

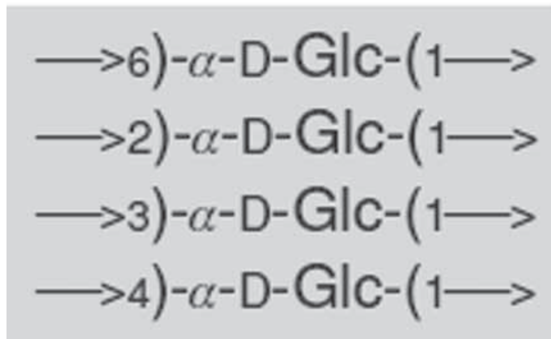
يعتبر الزانتان أكثر السكريات المتعددة الجرثومية أهمية من الناحية التجارية، ويبلغ الإنتاج الحالي له حوالى 20000 طن سنوياً. المُصنِّع الرئيسي لهذه المادة هي شركة Kelco التي هي جزء من Monsanto. استخدم الزانتان لأول مرة عام 1967. وغالباً ما يستعمل كمادة تثبيت أو تعليق أو صنع هلام أو للسيطرة على اللزوجة في الصناعات الغذائية. لقد استغلت هذه المواصفات كذلك في الأصباغ المائية وعدد كبير آخر من التطبيقات المنزلية والصناعية. يستخدم الزانتان الخام كمادة تعليق (Suspending) وتزييت خلال عمليات الحفر في الصناعات النفطية.

4.2.16 الدكستران Dextran

الدكستران (الشكل 4.16) عبارة عن α-glucan يحتوي على ارتباطات مختلفة، اعتماداً على الكائن المنتج. ينتج بواسطة أنواع مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام من ضمنها البكتريا *Leuconostoc mesenteroides* وأنواع *Sterptococcus*.

وعلى عكس معظم السكريات المتعددة الخارجية التي تصنع داخل الخلية، فإن الدكستران ينتج من السكروز بواسطة أنزيم خارج الخلية يسمى Dextransucrase، الذي يعمل على السكروز من خلال بلمرة وحدات الجلوكوز وإطلاق الفركتوز الحر إلى الوسط.

يتم التلاعب بمواصفات الدكستران عن طريق التحلل المائي لبوليمراته المترسبة بواسطة المذيب وذلك باستخدام أنزيمات ديكسترانيز خارجية، أو باستخدام حمض غير قوي للمعالجة، لتوليد منتوج ذي وزن جزيئي مرغوب. كان الديكستران أول متعدد سكري ميكروبي ينتج تجارياً وقد صنع بواسطة شركة Pharmacia لقرابة 50 عاماً. استخدم أولاً كمادة معدّلة (Extender) لبلازما الدم. أما الآن فله تطبيقات سريرية عديدة، مثل منع التخثر ولامتصاص السوائل في ضمادات الجروح. لا يزال السيفاديكس (Sephadex) وسط ترشيح هلامي معروف، وللدكسترانات في الوقت الحاضر تطبيقات مختبرية أخرى. ويستخدم الدكستران كذلك في المواد الغذائية.

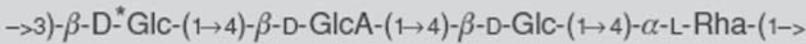


الشكل 4.16 تركيبة الديكستران. الربط السائد هو(6 → 1) - α.

5.2.16 الجيلان Gellan

الجيلان (الشكل 5.16) هو عبارة عن سكر متعدد متشكل (Heterpolysaccharide) خطي تتكون وحداته المتكررة من جزيئتي جلوكوز، وجزيئة حمض Glucuronic واحدة وجزيئة سكر رامنوز (Rhamnose) واحدة. الجيلان هو عبارة عن سكر متعدد مكوّن للهلام ينتج بواسطة البكتريا *Pseudomonas elodea*. تم تطويره من قبل شركة .Kelco Inc في الولايات المتحدة الأمريكية على شكل Gelrite عن طريق نزع الأسئلة (Deacetylation) لصمغ الجيلان الأصلي (عن طريق التسخين بدرجة حمضية pH = 10) الذي هو مؤستل (O – acetylated) على أحد جزيئتي الجلوكوز. فالمنتوج المنزوع الأستلة هو هلام قوي وهش، ويمكن أن يكون بديلاً للأجار والكاراجينان. يوفر الجيلان فوائد عديدة مقارنةً بالأجار (Agar) في تطبيقات الأحياء المجهرية: فهو مقاوم للتكسير الأنزيمي، وله قوة هلامية أعلى في تركيز أقل. يتأثر تكوين الهلام بدرجة الحرارة ووجود الأيونات الموجبة ويخضع البوليمر إلى تحول من الشكل الحلزوني إلى الحلزون المزدوج عند تكوين الهلام.

تمّت المصادقة على استعمال الجيلان في الغذاء وهو يستعمل بشكل واسع كمادة مثخنة.



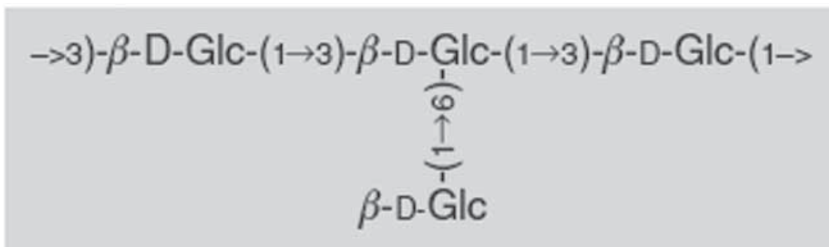
الشكل 5.16 تركيبة الجيلان . *هذا الجلوكوز يحمل مخلفات O – اسيتيل وغليسيريل في البوليمر الأصلي.

6.2.16 سكليروجلوكان Scleroglucan

السكليروجلوكان (الشكل 6.16) هو سكر متعدد متعادل يتكون من عمود فقري مكون من β-(3→1) Glucon، ومن فروع تتكون من وحدات جلوكوز مفردة مرتبطة بتتابع منتظم إلى كل ثالث وحدة جلوكوز في سلسلة البوليمر. هذه المادة هي سكر متعدد خارجي ينتج بواسطة الفطريات، حيث تنتجه أنواع مختلفة

من جنس *Sclerotium*. إن النوعين *Sclerotium Rolfsii* و *Sclerotium glucanicum* هما أكثر الأنواع أهمية في الإنتاج التجاري لهذه المادة.

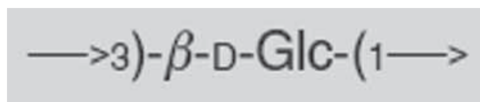
السكليروجلوكان هو عبارة عن سكر متعدد ذائب وهو بشكل بلاستك كاذب على مدى واسع من الــ pH ودرجات الحرارة ولا يتأثر بالأملاح المختلفة. يستخدم في تثبيت الطين أثناء عمليات الحفر وفي أصباغ اللاتكس وأحبار الطباعة وتغطية البذور (Seed coating).



الشكل 6.16: تركيب السلكليروجلوكان (Scleroglucan).

7.2.16 الكيردلان Curdlan

الكيردلان (الشكل 7.16) عبارة عن 1→3-β-glucan ينتج على شكل سكر متعدد خارجي بواسطة *Alcaligenes faecalis var. myxogenes*. تنتج البكتريا *Agrobacterium radiobacter* و *A. rhizogenes* و *Rhizobium trifolii* متعدد سكريات مشابه للكيردلان. وعلى عكس السكليروجلوكان، فإن الكيردلان لا يذوب في الماء ويكون هلاماً قوياً عند التسخين فوق 55 ˚C وإن تكوين هذا الهلام هو غير رجعي. يمكن استعمال الكيردلان كمادة مكونة للهلام في الأغذية المطبوخة، وكذلك كمادة ساندة للأنزيمات المقيدة الحركة. صفات الكيردلان تشابه صفات 1→3-β-glucan واللامينارين (Laminarin) الموجود في العديد من الطحالب البنية (Brown algae).

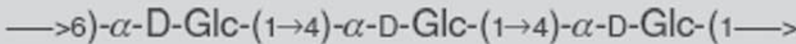


الشكل 7.16: تركيب الكيردلان.

8.2.16 البولولان Pullulan

البولولان (الشكل 8.16) هو عبارة عن α-Glucan مكون من وحدة سكر ثلاثي متكررة. ينتج تجارياً باستخدام الفطر *Aureobasideum Pullulans*. عملية التخمير بطيئة نسبياً (5 أيام) مقارنة بإنتاج السكريات المتعددة الخارجية من البكتريا، ولكن يتم تحول 70% من المادة الأولية (جلوكوز) إلى سكر متعدد.

يكون البولولان أغشية وألياف قوية يمكن تشكيلها (moulded). إن أغشية البولولان أقل نفاذية للأوكسجين من السيلوفان والبولي بروبيلين، وبما أنه منتوج طبيعي، فإن البولولان قابل للتكسير الحيوي. تنتج بوليمرات مشابهة للبولولان من قبل بعض البكتريا.



الشكل 8.16: تركيب البولولان.

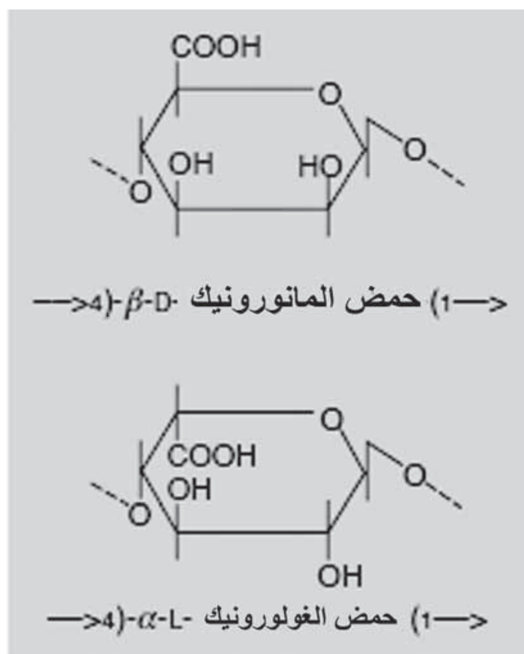
9.2.16 الجينيت Alginate

الجينيت هو عبارة عن بوليمر خطي يتكون من حمض مانيوروتيك Mannuronic وحمض Guluronic (الشكل 9.16). ينتج بواسطة البكتريا السالبة لصبغة جرام *Axotobacter vinelandii* وأنواع جنس *Pseudomonas*. إن هذا السكر المتعدد الخارجي البكتيري مشابه للألجنيت الطحلبي (عشب البحر)، باستثناء أن بعض وحدات حمض Mannuronic مؤستلة في الموقع O (O-acetylated).

تعتمد الوفرة النسبية لأحماض Mannuronic و Guluronic، ودرجة الأستلة على الكائن وظروف النمو. فالبوليمرات ذات المحتوى العالي من حمض Mannuronic هي على شكل هلام مطاط، في حين أن تلك الغنية بحمض Guluronic تأخذ شكلاً مختلفاً وهي هلام قوي وهش. إن الألجنيت ليست بوليمرات مساعدة عشوائية من حمض Mannuronic وحمض Guluronic. وإن المناطق المحتوية على مونومر (Monomer) أحادي (مثل 1- M-M-M-M-M- و -G-G– G-G-G-G) قد تتواجد في السلسلة. تعرف هذه بتراكيب القطعة (Block

structures) وهي تؤثر كذلك في شكل وخصائص البوليمر. تستخدم الألجنيت المشتقة من الأعشاب البحرية بشكل واسع في الصناعة الغذائية كمواد مثخنة ومكونة للهلام. كريات الألجنيت توفر طريقة بسيطة وفعالة لتقييد حركة الخلايا والأنزيمات. يخلط معلق الخلايا أو محلول الأنزيم مع أملاح الكالسيوم ويترك لينقط (Drip) على محلول من الألجنيت. تتشابك سلاسل السكريات المتعددة عن طريق ترابط الأيونات الموجبة الثنائية مع مجاميع الكربوكسيل، مكونة الهلام. إن الألجنيت مفيد كمادة أساس لتقييد حركة الخلايا، ولكنه قد لا يحتفظ بالأنزيمات بشكل كفوء.

لا يستخدم الألجنيت البكتيري تجارياً، وذلك لأن السلالات المنتجة غير مستقرة نسبياً وهي تفرز كذلك أنزيمات حالّة تعمل على خفض الوزن الجزيئي للمنتوج، ومع، أن هناك إمكانية عالية لاستخدامه تجارياً بسبب إمكانية توليد بوليمرات بمدى واسع من المواصفات من خلال الانتقاء المناسب للسلالة المنتجة وظروف التخمير.



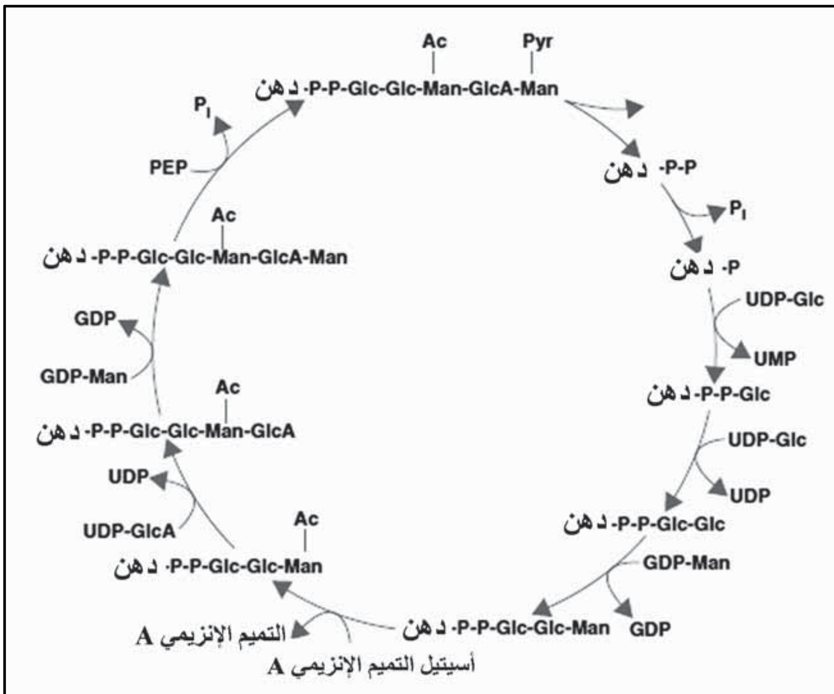
الشكل 9.16 تتألف الألجينات من حمض Mannuronic وحمض Guluronic. نسب وتسلسل هذه المونومرات تعتمد على مصدر البوليمر.

10.2.16 التخليق الحيوي للسكريات المتعددة

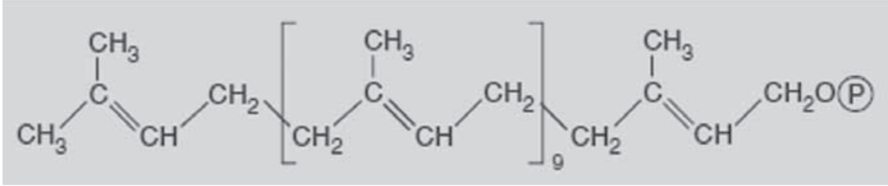
Biosynthesis of polysaccharides

يوضح الشكل (10.16) التخليق الحيوي للزانتان. يتم تجميع كل مونومر على ناقل دهني (الشكل 11.16) مثبت في الغشاء السايتوبلازمي، قبل نقلة إلى سلسلة البوليمر النامية. إن الناقل الدهني يكون مشابهاً، أو مماثلاً لمادة C55 Isoprenyl phosphate المستخدمة في التخليق الحيوي لطبقة الببتيدوجلايكان والسكريات المتعددة الدهنية في جدار البكتريا.

خلال التخليق الحيوي للزانتان تعمل النيوكليوتيدات السكرية، مثل Uridine diphosphate Glucose (UDP-Glucose) كمولدات منشطة توفر الطاقة المطلوبة لتكوين الأواصر الجلايكوسيدية بين السكريات الأحادية المتجاورة.



الشكل 10.16: التخليق الحيوي للزانتان في: Xanthomonas (Glucuronic acid = GlcA, Mannose = Man, Glucose = Glc, Guanosine Diphosphate = GDP, Urdine Diphosphate = UDP, Pyruvate = PEP. (انظر الشكل 11.16).



الشكل 11.16: تركيبة ناقل الدهن المشارك عادة في التخليق الحيوي للسكريات الجرثومية.

إن عمليات التخليق الحيوي لمعظم السكريات المتعددة الخارجية هي مشابهة بالأساس لعملية تخليق الزانتان، وإن الفروق هي خارج نطاق هذا الفصل. علماً، أن تخليق الديكستران داخل الخلية يختلف تماماً عن تخليقه الذي يحدث خارج الخلية. يعمل أنزيم خارج الخلية مفرد اسمه (Dextransucrase) على شطر السكر الثنائي (السكروز) إلى جلوكوز وفروكتوز، ومن ثم يعمل على بلمرة وحدات الجلوكوز ليكون الديكستران.

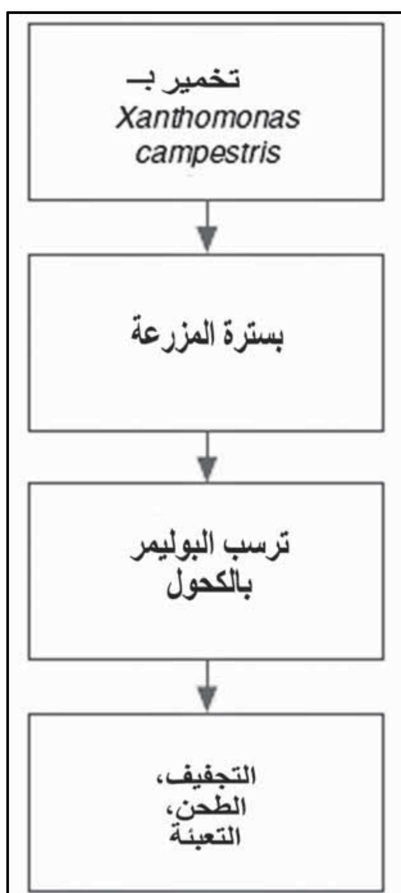
11.2.16 إنتاج السكريات المتعددة Production of polysaccharides

تنتج السكريات المتعددة الجرثومية في مزارع دفعة في مفاعلات الخزان المخفوق بوجود التهوية. تبدأ عملية التخليق الحيوي للسكريات المتعددة أثناء النمو وتستمر بعد توقف النمو. يؤدي إفراز السكر المتعدد إلى زيادة لزوجة المزرعة مما يحد من إمكانية الحصول على الكثافة المطلوبة من السكر المتعدد، وذلك لأنه يصبح من الصعوبة تحقيق مستوى ملائم من الخلط ونقل الأوكسجين في المزارع اللزوجة. علاوة على ذلك، فإن القوة المطلوبة لخفق المزارع اللزجة تكون عالية، وبالتالي فإن كلفة التخلص من الحرارة للحفاظ على الحرارة المطلوبة ستزداد.

إن عملية إنتاج السكريات المتعددة الجرثومية تفضل عموماً وجود نسبة عالية من الكربون/ النتروجين في الوسط. فمصدر النتروجين هو المادة الغذائية المحددة للنمو، ويضبط تركيزه لإنتاج التراكيز المطلوبه من الكتلة الحيوية. وقد يضاف مصدر كربوني إضافي بعد توقف النمو. بما أن الأيونات الموجبة يمكن أن تؤثر في خصائص السريان لمحاليل السكريات المتعددة فيجب توخي الحذر في تحديد التراكيز المثلى للأملاح المستخدمة كمغذيات في الوسط.

لا تستخدم المزارع المستمرة في إنتاج السكريات المتعددة الجرثومية. عند معدلات النمو العالي، التي تكون مرغوبة للحصول على إنتاجية عالية، وتستخدم نسب متزايدة من مصدر الكربون لغرض إنتاج الكتلة الحيوية وليس السكر المتعدد. علاوة على ذلك، فإن بعض الكائنات المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة ليست مستقرة في المزارع المستمرة وفي هذه الحالة يمكن أن يطغى نمو أنواع سلالات منتجة لتراكيز قليلة من السكر المتعدد على نمو السلالة المرغوبة. إن استقرارية السلالة لا تمثل مشكلة كبيرة في مزارع الدفعة (Batch cultures) لأن فترة الزرع تكون أقصر في هذه المزرعة.

مراحل إنتاج الزانتان موضحة في الشكل (12.16)

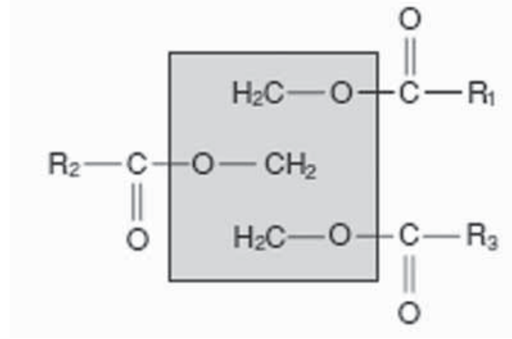


الشكل 12.16 إنتاج الزانثان.

3.16 زيوت الخلية المفردة Single cell oils CSCO5

1.3.16 المقدمة Introduction

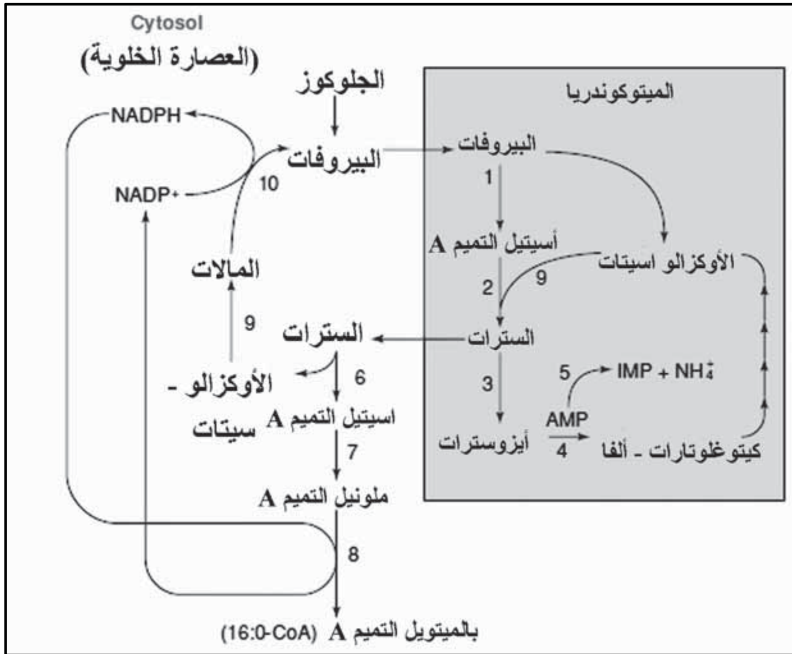
تعرف الدهنيات بقابليتها على الذوبان في المذيبات العضوية غير القطبية (الهكسان، الايثرثنائي الإثيل، إلخ) وعدم ذوبانها في الماء. فهذا هو تعريف صفاتها الفيزيوكيميائية وليس أصلها الكيموحيوي، وبهذا فإن المصطلح دهون (Lipids) يغطي مدى من المركبات ليست لها علاقة ببعضها البعض (تشمل الستيرولات (Sterols)، والكاروتيندات (Carotenoids)، دهونات (Fatty acylipid) وكذلك Polyhydroxyalkanoates. لأجل اختصار هذا الجزء، فإن الدهونات التي سنتطرق لها هنا مقصورة على الــ Fatty acyl lipids وأكثرها خصوصية Triacylglycerol lipid (TAG) (انظر الشكل 13.16). والتي تنتج بواسطة الكائنات المجهرية عن طريق عمليات التخمير، والمستخدمة في الوقت الحاضر للاستهلاك البشري. هذه هي إذن ما نطلق عليها اسم دهون الخلية المفردة.



الشكل 13.16 تركيبة جزيء Triacylglyceride : العمود الفقري للفليسيريل داخل المربع المظلل ومرفق بهذا العمود الفقري ثلاثة مخلفات للأسيل الدهنية التي تحتوي على السلاسل الأليفاتية R1، R2 وR3، على التوالي ، التي قد تكون مماثلة أو مختلفة عن الجميع.

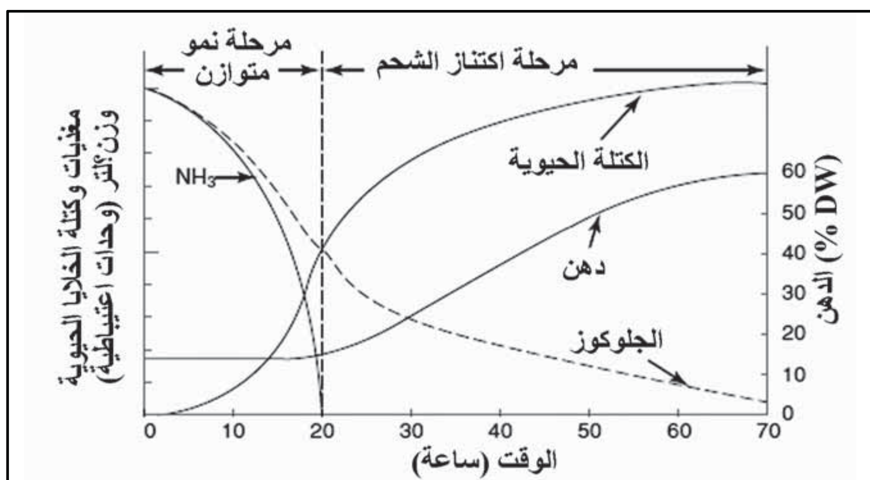
إن تخليق الأحماض الدهنية (Fatty acids)، الوحدات البنائية الأساسية لدهون الأسيل (lipids acyl)، هي عملية تجري في كل الخلايا الحية تقريباً، وإن الاستثناء الوحيد هو بعض الطفيليات المجبرة التي تحصل على الدهون من مضيفها. إن الكيمياء الحيوية لتخليق الدهون موثقة بشكل جيد في كتب الكيمياء المنهجية (انظر

الجزء 4.16) وسوف لا نتطرق إلى تفاصيلها هنا، ومع ذلك يوجد مخطط مختصر للعملية في الكائنات المجهرية المنتجة للدهون موضح في الشكل 14.16. يكفي أن نشير هنا إلى أن العقيدة الأساسية في تراكم الدهون هي عدم حدوث تراكم محسوس للـــ TAG في الخلايا النامية بنشاط. وإنما يحدث بعد أن تقوم الخلايا باستهلاك بعض المغذيات المهمة من الوسط، عادة النتروجين، بينما يبقى الكربون متوافراً (انظر الشكل 15.16) وعليه فإن جميع تخميرات دهون الخلية المفردة يجب أن تتضمن فترة من النمو النشط بوجود المغذيات الضرورية (لتكوين الكتلة الحيوية) متبوعة بفترة من النمو المحدود بوجود مصدر كربون، حيث تنضب أحد (على الأقل) المغذيات (عادة النتروجين) في حين يتم إنتاج TAG.



الشكل 14.16: مخطط يوضح الكيمياء الحيوية لتكوين الزيوت في الكائنات المجهرية.

الأنزيمات: (1) Pyruvate dehydrogenase، (2) = Citrate synthase، (3) Aconitase، (4) = NADH Isocitrate dehydrogenase – يحتاج إلى Amp لنشاطه. يتم نزع مجموعة الأمين من AMP بواسطة الأنزيم (5) عندها يفقد النتروجين مباشرة (انظر الشكل 15.16). (5) = (6) = AMP deaminase ATP (7) = Acetyle – COA، (8) Fatty acid synthase، (9) = Malate Dehydrogenase، (10) = Malic Enzyme.



الشكل 15.16: عملية تراكم الدهون في الكائنات المجهرية الدهنية (Oleaginous) في مزرعة الدفعة. يزرع هذا الكائن (الخميرة أو الفطر أو الطحلب) في الوسط الذي يكون فيه تركيز النيتروجين في (NH_3) محدداً. وعندما يتم استنفاد النيتروجين هذا تستمر الخلايا في أخذ الكربون الفائض (الجلوكوز) الذي لا يزال في الوسط . ثم يتم تحويل هذا الكربون في الكائن الدهني الى دهون التخزين ثلاثية الكربون(triacylglycerol).

الجدول 1.16: تركيب وتسمية الأحماض الدهنية

الاسم الشائع	التركيب الجزيئي	الاسم التصنيفي	التوصيف العددي
حمض البالمتيك Palmitic acid	$CH_3 (CH_2)_{14} COOH$	Hexadecanoic acid	16.0
حمض اللينوليك Y-Linolenic acid	$CH_3 (CH_2)_4 (CH=CH_2)_3 (CH_2)_2 CooH$	All cis -6, 9 12-Octatrienoic acid	18.3 (n-6)
حمض الأراشيدونك Arachidonic acid	$CH_3 (CH_2)_4 (CH=CH.CH_2)_4 (CH_2)_2 COOH$	14-Eicosatetraenoic acid	20.4 (n-6)
DHA	$CH_3CH_2(CH=CH.CH2)6$ CooH	All cis -4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid	22.6 (n-3)

تنتج البكتريا أحماض دهنية ذات تراكيب مختلفة، ومن ضمنها سلاسل متفرعة، حلقات سايكلو بروبان (Cyclopropane rings) وأواصر مزدوجة من نوع

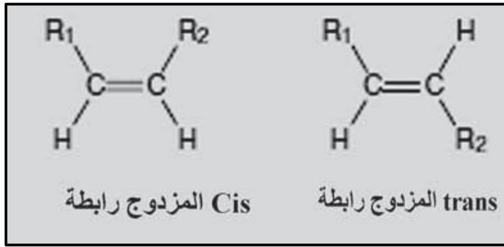
trans. علماً، بأن جميع الأحماض الدهنية المخلقة بواسطة الكائنات المجهرية حقيقة النواة والنباتات والحيوانات الراقية، وتضم كل الأحماض الدهنية ذات الأهمية الغذائية، تكون على شكل أحماض دهنية مستقيمة السلسلة تحتوي على أواصر مزدوجة من نوع cis فقط (انظر الشكل 16.16) والتي تبعد عن بعضها البعض عادة بمسافة ثلاث ذرات كربون، وكل أصرة مزدوجة تكون مفصولة بواسطة methyl Carbon.[يشار إليها بالمعترضة بالمثيلين (Methylene interrupted)]، أي $–CH = CH – CH_2$– $– CH = CH$- (انظر الجدول 1.16 للأمثلة).

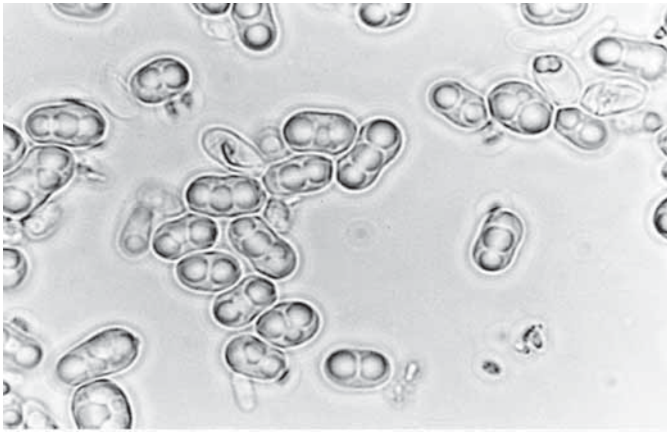
على الرغم من أن جميع الكائنات تخلق الأحماض الدهنية، إلّا أن تراكم كميات محسوسة من TAG ليس عاماً. الكائنات بدائية النواة عموماً لا تنتج TAG كمواد خزن – وإنما تعمد هذه الكائنات على إنتاج Polyhyroxyalkanoates أو السكريات المتعددة. كما ذكر سابقاً فإن الغالبية العظمى من دهون الأسيل الموجودة فيها تكون على شكل دهون مفسفرة (Phospholipids – PL). أما إنتاج TAG في الكائنات حقيقية النواة فإنه يختلف حسب النوع. فالكائنات التي تراكم كميات محسوسة من TAG (أكثر من 20% وزن/وزن) من وزنها الجاف) توصف بأنها كائنات مجهرية دهنية (Oleaginous microorganisms)، في حين توصف الكائنات التي لا تراكم كميات محسوسة من TAG بأنها غير دهنية. من الواضح، أن الأنواع الدهنية هي التي ستكون موضوع هذا الجزء.

إن الأسس الكيموحيوية الدهنية الكائنات المجهرية معروفة بشكل جيد (انظر الشكل 14.16 وكذلك الجزء 4.16). يوضح الشكل 17.16 صورة لخميرة دهنية نموذجية.

إن هذا إذاً يضع حدوداً لهذا الجزء، بمعنى أن الدهون التي سيتم مناقشتها هي Triacylglycerols التي تحتوي على أحماض دهنية ذات سلسلة مستقيمة بأواصر مزدوجة على شكل cis والتي تكون مفصولة عن بعضها البعض بواسطة ذرة مثيلين كربون (Methylene carbon).

الشكل 16.16: تركيبة الأواصر المزدوجة trans وcis. الأواصر المزدوجة "تقفل" تركيبة الأحماض الدهنية، وتؤدي إلى وجود أيزومرات trans وcis. الأحماض الدهنية في النظم البيولوجية هي على وجه الحصر تقريباً الأيزومر cis. R1 و R2 اللتان تمثلان سلاسل الأسيل في جزيء الحمض الدهني واحد الذي سيمتلك مجموعة الميثيل (CH3) على الطرف، بينما الآخر يمتلك مجموعة حمض الكاربوكسيل (COOH) .



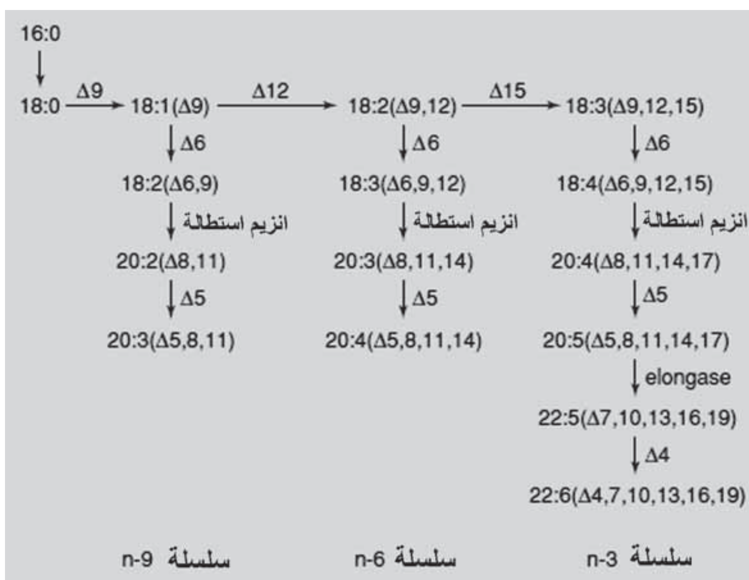


الشكل 17.16: صورة مجهرية لكائن مجهري زيتي نموذجي هذه هي صورة لـــ *Cryptococcus curvatus*، المعروف سابقاً باسم *Apiotrichum curvatum*. تعبأ الخلايا بقطرات زيت تصل إلى 70 ٪ من الكتلة الاجمالية.

2.3.16 تسمية الأحماض الدهنية Nomenclature of fatty acids

قد تبدو تسمية الأحماض الدهنية مربكة وذلك لإمكانية استخدام، وفي معظم الحالات، أي من الأسماء الثلاثة اعتماداً على ما يفضله الكاتب. وهذه الأسماء يمكن أن تكون: (1) الاسم التصنيفي (Systematic name) (2) الاسم الشائع (Trivial name) و (3) التوصيف العددي (Numerical designation). يوضح الجدول (1.16) الأسماء المختلفة لبعض الأحماض الدهنية المختارة. وعلى الرغم من دقة الأسماء التصنيفية، إلّا أنها تكون عادة طويلة ومربكة للأشخاص غير المطلعين على

كيميائية الدهون، ونتيجة لذلك فنادراً ما يتم استعمالها. على العكس فإن الأسماء الشائعة لا تعطي معلومات مباشرة حول تركيب الحمض الدهني، ولكنها مع ذلك لازالت تستخدم بشكل واسع في الدوائر العلمية وغير العلمية. للتوصيف العددي فائدة مزدوجة حيث يكون مختصراً، ولكنه يشير بوضوح إلى التركيب الكيميائي للحمض الدهني. في التوصيف العددي (انظر الجدول 1.16) يشير الرقم قبل الضمة (Colon) إلى عدد ذرات الكربون المكونة لسلسلة الأسيل، في حين يعطي الرقم الواقع بعد الضمة عدد الأواصر المزدوجة التي يحتوي عليها الحمض الدهني. التوصيفات n-3 و n-9 تعلم القارئ بالسلسلة التي يعود إليها الحمض الدهني (انظر الشكل 18.16) وتشير إلى موقع آخر أصرة مزدوجة (محسوبة من طرف الحمض الدهني الحاوي على مجموعة المثيل). وبما أن جميع الأواصر المزدوجة هي معترضة بالمثيلين (انظر أعلاه)، فحالما يتم تحديد موقع الأصرة المزدوجة النهائية سيمكن استنتاج مواقع جميع الأواصر المزدوجة الأخرى.

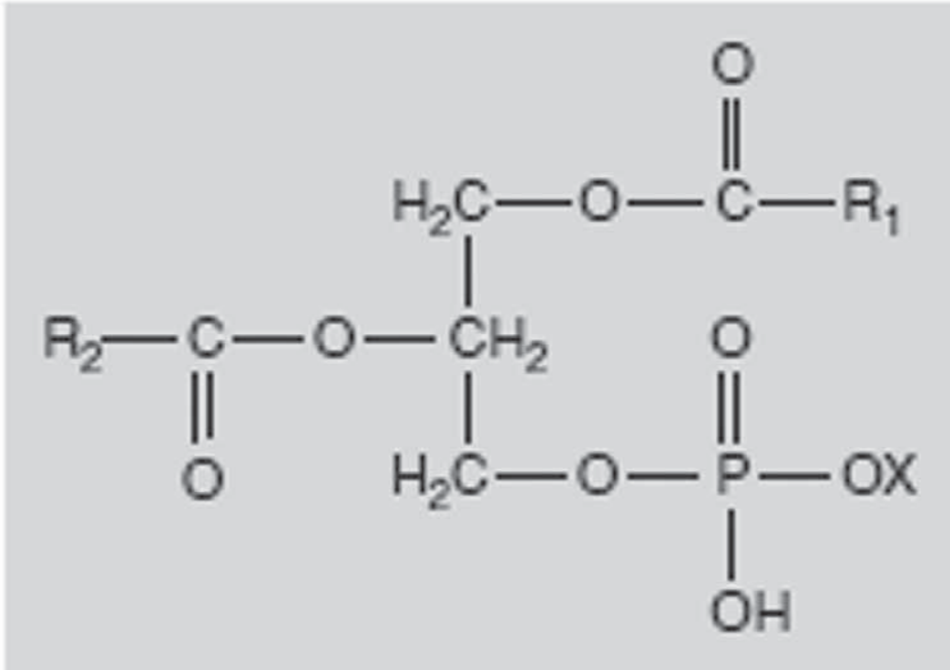


الشكل 18.16: خطة شاملة للتعديلات على الأحماض الدهنية بعد التخليق الجديد (Dc-novo synthesis) تعمل نزيمات Elongases على زيادة طول سلسلة الأحماض الدهنية عن طريق إضافة وحدة C_2 (أسيتيل التميم) الأنزيم Desaturases، المشار إليها بالرمزΔ، تدخل رابطة مزدوجة بين ذرتي C مجاورتين. لا تعطى إلّا ذرة C الأولى ويدل على ذلك بالرقم : وهكذا Δ9 يعني أن الرابط من ذرة C9 إلى ذرة C10 هو الآن رابط مزدوج. أصبح الحمض الدهني غير مشبع.

3.3.16 الدور الوظيفي لدهون الخلية Functional roles of cell lipid

توجد غالبية دهون الخلية (من نوع الأسيل) بأحد شكلين، إما أن تكون على شكل Triacylglycerol (TAG)، (الشكل 13.16)، وهو مركب خزن في الخلية لأنه غني بالطاقة (أكثر من البروتين والكربوهيدرات معاً)، أو تكون على شكل دهون مفسفرة (PL)، (الشكل 19.16)، التي هي عبارة عن مركبات بنائية أساسية في كل الأغشية الحيوية (صانعة الطبقة الدهنية المزدوجة – Lipid bilayer).

إن الـــ TAG خامل فسلجياً، ويلعب دوراً في الخزن (كطريقة ضد التجويع في المستقبل) أو في الحماية ضد البرد (الدهن في اللبائن البحرية) أو كمادة حشوية حول الأعضاء الحيوية.



الشكل 19.16 : تركيبة جزيء فسفوليبيد: X يمكن أن يكون H إيثانولامين، سيرين، اينوزيتول، الكولين، الجليسرول، الخ. عندما تكون المجموعة المرفقة H يكون الجزيء حمض الفسفاتيديك، تتم تسمية الآخرين فسفاتيديل X (أي فسفاتيديل إيثانولامين، الخ.).

الجدول 2.16 تركيبة الـ Fatty acyl لزيت ولدهن		
الحمض الدهني	**لارد (دهن الخنزير)**	**زيت كانولا**
المظهر في درجة حرارة الغرفة	صلب (دهن)	سائل (زيت)
الأحماض الدهنية المشبعة (% الأحماض الدهنية الكلية)		
16:0	25	3
18:0	13	1
الأحماض الدهنية أحادية اللاتشبع (% الأحماض الدهنية الكلية)		
16:1	3	–
18:1	43	64
22:1	–	1
الأحماض الدهنية عديدة التشبع (% الأحماض الدهنية الكلية)		
18:2	11	22
18:3 n-2	< 0.5	8
خلاصة		
% الكلية للأحماض الدهنية المشبعة	38	4
% الكلية للأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة	11	30
% الكلية للأحماض الدهنية ذات السلسلة القصيرة	27	3

وعلى العكس من ذلك فإن الدهون المفسفرة في أغشية الخلية تلعب دوراً رئيسياً في الحفاظ على فعاليات الخلية وتنظيمها. فبدلاً من أن تكون مجرد حواجز بين الحجيرات الخلوية المختلفة، فإن الأغشية الحيوية تكون الموقع الرئيسي لحدوث تفاعلات كيموحيوية أساسية وعديدة – فإن العديد من الأنزيمات تكون إما مرتبطة بالغشاء أو مرافقة له (سلاسل نقل الاكترونات مثلاً) وتعتمد في نشاطها على البيئة الغشائية المناسبة.

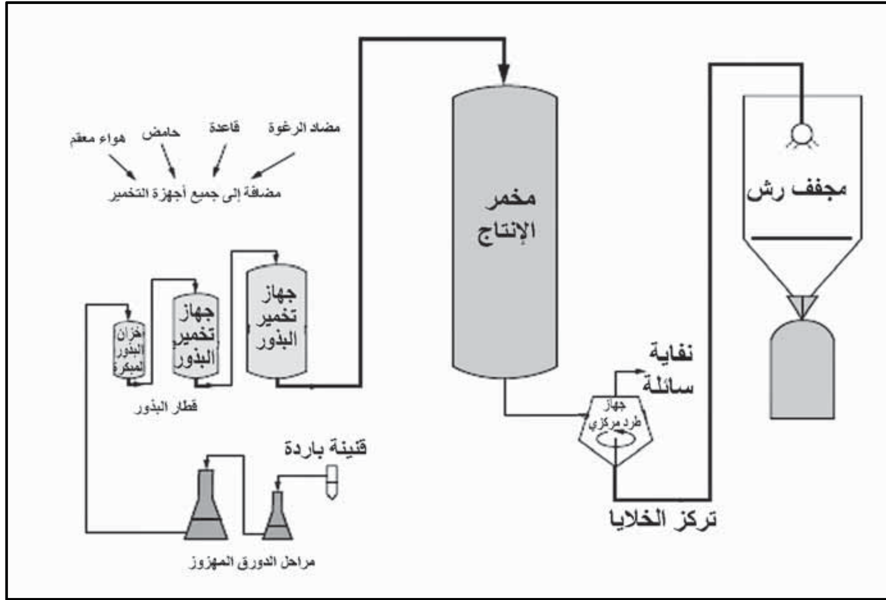
تمثل سيولة الغشاء (Membrane fluidity) عاملاً رئيسياً في تحديد فعالية الأنزيمات المرافقة للغشاء. والعامل الرئيسي في تنظيم بيئة سيولة الغشاء هو

طبيعة الــ Fatty acyl في الدهون المفسفرة، في الطبقة الدهنية الثنائية. فكلما كانت الأواصر المزدوجة الموجودة في سلسلة الأسيل أقل (نزع التشبع – Destaturation)، كانت نقطة الانصهار (Melting point) لهذا الحمض الدهني أعلى. وكذا الحال بالنسبة إلى نقطة انصهار أي دهن (سواء كان TAG أو PL) حاوي لذلك الحمض الدهني. ويمكن ملاحظة هذه الظاهرة في الاختلاف بين الدهون (مثل دهن الخنزير لارد) والزيوت النباتية (مثل زيت الكانولا) – (انظر الجدول 2.16). تحتوي الدهون (الصلبة في درجة حرارة الغرفة) على مستوى أعلى من الأحماض الدهنية المشبعة ذات السلاسل الطويلة (لا يوجد أواصر مزدوجة) والمرتبطة بعمود فقري مكون من الجليسرول (انظر شكل 13.16). وعلى العكس من ذلك، تحتوي الزيوت (السائلة في درجة حرارة الغرفة) على تواجد أكبر للأواصر المزدوجة (أحماض دهنية غير مشبعة) وعند وصول طول سلسلة الحمض الدهني إلى 18 أو 20 ذرة كربون، سيكون هناك عادة عدة أواصر مزدوجة (تعرف باسم الأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة -Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA) في الجزيئة للحفاظ عليها بشكل سائل.

بما أن هذه الظاهرة تمتد إلى الدهون المفسفرة، وبالتالي إلى الأغشية، فإن طبيعة الأحماض الدهنية المكونة للدهن المفسفر الغشائي لها تأثير كبير في سيولة الغشاء، بالفعل. ومن الحقائق المعروفة أن عدة كائنات مجهرية تستجيب لنقص درجة حرارة النمو بزيادة مستوى الأحماض الدهنية غير المشبعة في أغشيتها الخلوية. وبهذا العمل تمنع هذه الكائنات النقصان في سيولة الغشاء، الذي كان سيحدث عند نقص درجة الحرارة، من خلال إنتاج أغشية أكثر سيولة.

بالإضافة إلى دورها في الخزن والبناء، فإن بعض الأحماض الدهنية هي مولدات لعدد من الجزيئات المؤثرة في الخلية. إن حمض (20: 4n – 6, ARA) Arachidonic وحمض Eicosapentaenoic (20:5n-3, EPA) هما مولدان لعدد من المركبات المؤثرة القوية في الخلية (وهي مركبات Eicosanoids و Prostaglandins و Leukotrienes) في الحيوانات الراقية ومن ضمنها

الإنسان. وتشترك هذه الجزيئات في تنظيم عدد من العمليات الخلوية مثل الاستجابات الالتهابية، وتخثر الدم، ووظائف تناسلية. أن ARA وEPA هما الأعضاء المقابلة لمجموعة الأحماض الدهنية N - 6 و n - 3 (الشكل 18.16) وإن الجزيئات المؤشرة المشتقة منهما تخلق بواسطة نفس الأنزيمات، بالرغم من هذا الاختلاف بالتركيب. وبهذا فإن ARA وEPA تتنافس على المواقع الفعالة في الأنزيم. وبما أن الجزيئات المؤشرة المخلقة من ARA وEPA غالباً ما تنظم نفس العملية الخلوية، ولكن بشكل متضارب (Antagonistic)، فإن النسبة الخلوية لـــ EPA/ARA يمكن أن تكون ذا تأثير كبير في بعض استجابات الأتزانات (Homeostatic responses).



الشكل 20.16: مخطط يوضح المراحل المختلفة لعملية التخمير المستخدمة لإنتاج زيت الخلية الواحدة (single cell oil). ويزرع الكائن الحي المختار عبر سلسلة من المخمرات باستخدام كميات لقاح حوالى 10 ٪ في كل مرحلة فقط في المرحلة النهائية يتم تشكيل الوسط مع تركيز منخفض من NH_3 وتراكيز عالية من الجلوكوز (انظر الشكل 15.16)، ذلك لأنه وحتى هذه المرحلة، يتم زرع لكائن المجهري في مخمرات البذور لإعطاء أقصى كثافة خلايا، وليس أقصى مستويات دهون. يتم حصاد الخلايا بعد أن تحصد من مخمر الإنتاج، وتجفف، وأخيراً تستخلص مع الهكسين لإزالة الزيت.

من الأمور ذات العلاقة بهذا الفصل هو الدور الذي تلعبه ARA ومادة PUFA أخرى ذات سلسلة طويلة جداً وهي حمض Docosahexaenoic (22: 6n -3, DHA)، في تطوير أنسجة العين والأعصاب. وعلى الرغم من أن هذين النوعين من الأحماض الدهنية ليسا من الأحماض الدهنية الرئيسية، إلّا أنهما يشكلان في الطبيعة أكثر أنواع PUFA شيوعاً في الدهون المفسفرة الموجودة في الأنسجة العصبية، ومن ضمنها الدماغ، وكذلك في العين. يتواجد هذان الحمضان الدهنيان في حليب الرضاعة للإنسان، وإن إضافتهما إلى تركيبة حليب الأطفال – Infant formula – (عادة بشكل خالٍ من DHA و ARA) قد أثبتت فائدتها في عملية تطوير النظر والذكاء. هذا ويضاف هذان الحمضان في الوقت الحاضر إلى حليب الأطفال في أكثر من 60 بلداً، في مختلف مناطق العالم.

4.3.16 محاسن ومساوئ زيوت الخلية المفردة

Advantages and disadvantages of SCOs

إن إنتاج الكائنات المجهرية لمدى واسع من الأحماض الدهنية كان معروفاً منذ بداية القرن العشرين، وتعود محاولات إنتاج الزيت بكميات كبيرة من الكائنات المجهرية إلى أيام الحرب العالمية الثانية في ألمانيا. علماً، أن أول عملية تجارية لإنتاج زيوت الخلية المفردة بدأت عام 1985 (إنتاج الزيت الجاوي – Oil of Javanicus باستخدام الفطر *(Mucor circinelloides)* ولكن لم تصبح عملية إنتاج هذه الزيوت ناجحة تجارياً إلّا في بداية القرن الواحد والعشرين. إن السبب الرئيسي لفشل تنافس الزيوت مكروبية المصدر مع الزيوت المعزولة من المصادر التقليدية (النباتات والحيوانات/الأسماك) كان كلفتها العالية وصعوبة إنتاجها. لكي ننتج زيوت الخلية المفردة نحتاج إلى زرع كميات كبيرة من الكتلة الحيوية الجرثومية، لأن الزيت يخزن داخل الخلايا. على الرغم من الإشارة في الأبحاث إلا أن نسبة وجود الدهون قد تزيد على 70% من الوزن الجاف، فإن المعروف أن معظم الكائنات المجهرية النموذجية تراكم حوالى 50% من وزنها الجاف على شكل دهن. إضافة إلى ذلك فإن التخميرات عموماً لا تستطيع توليد أكثر من 200

غم من الكتلة الجافة لكل لتر من المزرعة. وبالنتيجة لكي ننتج طن (1000 kg) من الزيت نحتاج إلى إنماء أكثر من 10000 لتر من المزرعة. في البداية، لم تكن التقنية المطلوبة لإجراء هذا النوع من التوسع في مزارع الميكروبات متوفرة وقد تطورت مثل هذه التقنيات خلال الفترة ما بين عقد الأربعينيات إلى عقد الستينيات من القرن العشرين، كجزء من الجهد لإنتاج بروتين الخلية المفردة (بديل ميكروبي للحم) باستخدام أنواع مختلفة من البكتريا والخمائر النامية على الهيدروكربونات أو الميثانول. يلاحظ أن الاسم زيوت الخلية المفردة قد استخدم ليشير إلى المقارنة ببروتين الخلية المفردة ولتجنب استخدام كلمات مثل الكائنات المجهرية أو الميكروبات، والتي سيكون لها صدى غير مقبول في أذهان الناس إذا أرادوا شراء بروتين أو زيت ميكروبي.

حتى مع التقدم في تقنية إنماء مزارع جرثومية بكثافات عالية وبمستويات ضخمة، فإن عملية إيصال زيوت الخلية المفردة إلى المرحلة التجارية لم تكن سهلة. فقد كانت تقنية التخمير مكلفة في إنشائها وعملها. ونتيجة لذلك كان إنتاج زيوت الخلية المفردة (ولا زال) مكلفاً ويجب أن يجذب سعراً عالياً لكي تكون ذات جدوى تجارية.

إن محاولات استخدام الكائنات المجهرية القادرة على استخدام الضوء كمصدر للطاقة (Phototrophic) (طحالب مجهرية مختلفة) لغرض اختزال كلفة زيوت الخلية المفردة، على أساس أن مصادر الكربون (CO_2) والطاقة (ضوء الشمس) متوفرة مجاناً، لم تثبت نجاحها. بسبب الكثافة المنخفضة لخلايا المزرعة، كنتيجة للتضليل الذاتي (Auto shading) (الخلايا الواقعة على سطح الوسط هي فقط تحصل على تعرض كامل لضوء الشمس)، والتبادل الغازي (لإزالة O_2 المتكون أثناء التخليق الضوئي) والحاجة إلى حصد أحجام هائلة من مرق المزرعة (Broth) (بسبب إنخفاض كثافة خلايا المزرعة) أدت إلى أن تكون كلفة الإنتاج المعتمدة على التخليق الضوئي أكثر من كلفة التخمير بواسطة الكائنات المجهرية عضوية التغذية (يستخدم الجلوكوز أو مصدر كربوني آخر مناسب).

ولكي يمكن لزيوت الخلية المفردة أن تجتذب السوق يجب أن تتميز بمحاسن تفوق الزيوت الأخرى (المستخرجة من النباتات أو الحيوانات/ الأسماك) التي يمكن إنتاجها بتكاليف أقل. بالنسبة إلى أول زيت من زيوت الخلية المفردة، [(زيت جاوه (Javanicus oil)] فإن ميزته كانت تكمن بغناه بمادة حمض اللينوليك γ − Linolenic (18:3n – 6, GLA). GLA هي مادة فعّالة في زيت زهرة الربيع المسائية (Evening primrose oil) الذي له قيمة عالية (وبالتالي غالي السعر) كعلاج شعبي لعدد من الأمراض (من ضمنها أعراض ما قبل دورة الطمث والأكزيما). وفي حين أن زيت زهرة الربيع المسائية يحتوي على 8% GLA فقط، فإن زيت الخلية المفردة يحتوي على 18-20% GLA (الجدول 3.16). وعلى الرغم من أن هذه الميزة كانت كافية لتطوير هذه الزيوت تجارياً، إلّا أن استمرار هذه العملية جابهت مشكلة كبيرة في ما بعد بسبب الإنتاج التجاري لزيت لسان الثور (Borage oil) الذي هو بديل نباتي المصدر وأغنى بمادة GLA من زيت الخلية المفردة. ومع أن نبات لسان الثور ليس من المحاصيل الزراعية المثالية، إلّا أن زيت لسان الثور تمكن أن يكون منافساً قوياً لزيت جاوه، إلى درجة أن إنتاج الأخير توقف عام 1990 بعد ست سنوات فقط من إنتاج زيت لسان الثور.

يوضح هذا المثال شيئاً مهماً وهو أن زيوت الخلية المفردة لا يمكن أن تتنافس، اقتصادياً، وبصورة مباشرة مع الزيوت المشتقة من المصادر النباتية أو الحيوانية. وقد جرت محاولات أخرى في الفترة الأخيرة لإنتاج منافس من أصل ميكروبي لزبد الكاكاو و/أو مشابه لزبد الكاكاو (Cacoa butter equivalent)، وعلى الرغم من إظهارها هذه المحاولات تقنيات مثيرة للإعجاب، إلّا أنها أكدت النقطة السابقة. فمن خلال استعمال المثبطات والتغذية بالمادة الأولية وانتقاء السلالات، أمكن جعل الخمائر قادرة على تخليق ومراكمة زيت يقترب في خواصه من تركيب زبد الكاكاو. وعلى الرغم من ذلك، وحتى بعد تطوير طريقة يمكنها استخدام الفضلات الناتجة من صناعة الألبان (بكلفة صفر) فإن هذا المنتوج كان لا يزال غير مجدٍ اقتصادياً.

الجدول 3.16 مكونات الأحماض الدهنية لزيوت مختارة مستخرجة من النباتات، والأسماك ومن الخلية المفردة

المصدر	*Saccharomyces cerevisiae*	*Mucor circinelloides*	*Mortierella alpina*	*Crypthecodinium cohnii*	*Schizochytrium sp.*	زيت لسان الثور	زيت زهرة الربيع المسائية	زيت فول الصويا	زيت كبد السمك
نوع الكائن المجهري	خمائر	فطريات	فطريات	طحلب مجهري	طحلب مجهري	نبات	نبات	نبات	حيوان/أسماك
16:0	15	22	14	20	29	10	6	12	13
16:1	42	1		1	12				6
18:0	5	6	5	1	1	4	2	3	2
18:1	35	40	4	14	2	16	8	23	27
18:2	–	11	4	–	3	40	75	56	10
18:3n-3	–	–	–	–	–	Tr.	Tr.	6	3
18:3n-6	–	18	3	–	–	22	8	–	–
20:4n-6	–	–	55	–	–	–	–	–	1
20:5n-3	–	–	–	–	–	–	–	–	10
22:5n-6	–	–	–	–	12	–	–	–	
22:6n-3	–	–	–	30	25	–	–	–	5

الجدول 4.16 محاسن ومساويء زيوت الخلية المفردة

المحاسن	المساوئ
تركيب بسيط من الأحماض الدهنية	عالي الكلفة
لا يتأثر بالعوامل الجغرافية أو البيئية	إمكانية إنتاج محدودة
يمكن ضمان النوعية والتجهيز	قد يجابه بقبول سلبي من الرأي العام
غني جداً بالحمض الدهني المرغوب	

على الرغم من الكلفة العالية لتقنية التخمير المطلوبة لإنتاج زيوت الخلية المفردة هذه الزيوت يمكن أن تصبح، وقد أصبحت حقيقة تجارية. وبالتأكيد، يمكن أن يكون لها مزايا معينة أفضل مما هو موجود في الزيوت ذات المصادر التقليدية وذلك نتيجة أصلها التخمري (الجدول 4.16).

يحتوي العالم الميكروبي على أنواع متنوعة وهائلة العدد، وينعكس هذا التنوع على المدى الواسع من الأحماض الدهنية الموجودة في دهون الخلايا الجرثومية. في حين لا تحتوي الزيوت النباتية على أحماض دهنية غير مشبعة متعددة ذات سلاسل كربونية تزيد على 18، فمن المعروف وجود دهون جرثومية تحتوي على مستويات عالية من DHA (22: 6n-3) (الجدول 3.16). كذلك تحتوي بعض زيوت الحيوانات/ الأسماك على سلسلة PUFA طويلة جداً، ولكن،

في هذه الحالات، تكون الأحماض الدهنية بمستويات منخفضة (عادة أقل من 10% من الأحماض الدهنية الإجمالية). وتشكل جزءاً داخل نمط دهني معقد. يجب الإشارة إلى أن سلسلة PUFA الطويلة التركيبة للزيوت الحيوانية هي انعكاس لأخذهم التغذوي وليس لتخليقهم بواسطة الكائن الحي.

وبهذا فإن الزيوت الحيوانية لا تكون معقدة فقط، وإنما مختلفة كذلك بسبب العوامل الجغرافية والمناخية. أما الزيوت جرثومية الأصل فإنها تعكس فقط قدرة الكائن الكيموحيوية على تخليق الأحماض الدهنية. ويؤدي هذا إلى إنتاج زيت ذي نمط بسيط من الحمض الدهني، يمكن أن يكون غنياً جداً بالحمض الدهني المرغوب الذي يمكن إعادة إنتاجة بسهولة (الجدول 3.16).

إن مبادئ التقانة الحيوية لزيوت الخلية المفردة، هي إنماء الكتلة الحيوية في خزان مغلق تحت ظروف مسيطر عليها، كمزرعة تحتوي على نوع فقط من الكائنات (أي، مزرعة أحادية)، وتعني أيضاً إمكانية السيطرة على نوعية المنتوج واستبعاد احتمالية التلوث بالملوثات البيئية مثل المبيدات الحشرية والعشبية وحتى السموم الناتجة من التلوث الجرثومي، وجميع هذه الأشياء هي مواضيع سببت قلقاً لدى بعض الجهات حول نوعية الزيوت المعزولة من المصادر التقليدية (النباتات وبعض الحيوانات).

بما أن فترة التخمير تدوم لأيام فقط، فسيكون من الممكن ضمان ليس النوعية فقط وإنما كمية المنتوج كذلك. إن الظروف المناخية سواء كانت جفافاً أو فيضاناً، بالإضافة إلى العوامل الأخرى مثل الاستغلال الجائر للمصادر (مثلاً، الصيد الجائر للأسماك) لا تهدد إنتاجية المخمرة. وبهذا يكون إنتاج زيوت الخلية المفردة مستولداً، مع الحفاظ على مستوى عالٍ جداً من النوعية، ويمكن زيادة أو إنقاص تجهيزه بسرعة وحسب متطلبات السوق.

5.3.16 الإنتاج الحالي لزيت الخلية المفردة Current SCO production

يمكن لزيت الخلية المفردة، وكما ذكر أعلاه، أن ينافس الزيوت التقليدية فقط إذا أمكن إثبات فائدة مميزه للزيوت الجرثومية، وتلك الفائدة تجنى سعراً عالياً

للزيت. حالياً، تمتلك الزيوت الجرثومية الغنية بحمضين دهنيين مثل هذه الشروط وهي تنتج حالياً (2005).

هذان الحمضان الدهنيان هما (Arachidionic acid (ARA, 20:4n -6 و (Docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n -3. تكمن أهمية هذين الحمضين في تغذية الأطفال الرضّع، وبهذا فزيت الخلية المفردة المحتوي على ARA و DHA يضاف هذه الأيام إلى حليب الأطفال الرضّع في مختلف مناطق العالم. وفي الولايات المتحدة الأمريكية، ومنذ عرض حليب الأطفال الذي يحتوي على ARA/DHA في شباط عام 2002، فإن هذا الحليب قد سيطر على 70% من السوق.

لا يتواجد DHA أو ARA في أي زيت تقليدي مناسب سواء كان من النبات أو الحيوان. فالنباتات لا تخلق سلاسل PUFA طويلة جداً (طول السلسلة أقل من 18). أما بالنسبة إلى المصادر الحيوانية، فعلى الرغم من أنها تحتوي على هذين الحمضيين، إلاّ أن مستوى احتوائها على سلاسل PUFA الطويلة هذه متواضع، وهي غير مناسبة لإضافتها إلى حليب الأطفال الرضّع. من المعروف أن زيوت الأسماك، خاصة، تحتوي على أحماض دهنية من نوع n-3، من ضمنها DHA، إلّا أنها تحتوي أيضاً على -Eicosapentaenoic acid (EPA, 20: 5n (3 الذي لا يمكن إضافته إلى حليب الأطفال الرضّع لأنه يعرقل نمو الرضيع. ولهذا فإن هناك حاجة إلى زيت غني بـــ DHA وخالٍ من EPA.

إن الكائنات المجهرية التي تراكم كميات عالية من دهون الخلية على شكل Triacylgycerol (الدهن المفضل للاستعمالات الغذائية، وهو الدهن الذي يتواجد طبيعياً في حليب صدر الإنسان) والغني جداً بـــ ARA أو DHA. وهناك على الأقل ثلاثة من هذه الكائنات المجهرية التي تم تطويرها لتصبح حقيقة تجارية. تتبع جميع عمليات إنتاج زيوت الخلية المفردة نفس الخطوات الأساسية (الشكل 20.16) التي تشمل مزارع لقاح بأحجام متزايدة لغرض إجراء التلقيح النهائي لخزان المخمر الضخم. حال الوصول إلى مزرعة جرثومية ذات كثافة الخلية ومحتوى

دهني مناسب، يتم تفريغ الخزان (لغرض التنظيف والتعقيم وإعادة الاستخدام). ويُحصد بعد ذلك مرق النمو لإزالة الكتلة الحيوية التي يتم تجفيفها واستخلاصها باستخدام الهيكسان في عملية مشابهة لعملية استخلاص الزيوت من البذور النباية. يُعالج الزيت المستخلص بعد ذلك مرة أخرى باستخدام تقنيات مشابهة لتلك المستخدمة في صناعة الزيوت النباتية.

إن أحد أهم خصائص زيوت الخلية المفردة التي يجب الانتباه إليها هي خاصية الطبيعة غير المشبعة لأحماضها الدهنية. إن كل زيت من زيوت الخلية المفردة الغنية بـــ ARA وDHA يحتوي على أكثر من 40% ARA (أربع أواصر مزدوجة) وDHA (ست أواصر مزدوجة) على التوالي. إن كلاً من هذه الأواصر المزدوجة يمكن أن يكون موقعاً للأكسدة التي تقود إلى الزناخة (Rancidity) وتغير الطعم (Off flavor). بصورة عامة، كلما كان الحمض الدهني غير مشبع أكثر كان أقل استقراراً. لهذا السبب يجب معاملة هذه الزيوت بحذر تام خلال الاستخلاص والمعالجة، كما يجب التعامل بحذر مع الكتلة الحيوية للكائن المجهري قبل عملية الاستخلاص، لكي نتجنب تكسير الحمض الدهني الذي يؤدي إلى طعم غير مرغوب. عموماً، إن الخطوات المتبعة لجعل الزيت مستقراً تتضمن: معالجته بسرعة، وخزن الكتلة الحيوية والزيت في درجة حرارة منخفضة وبوجود نيتروجين (لعزل الأوكسجين O_2) وتسخين محدود. وغالباً ما تستخدم، خلال عملية حصاد الكتلة الحيوية، خطوة تسخين سريع (بسترة). لهذه الخطوة فائدتان: تجنب التلوث البكتيري خلال مراحل الحصاد وقتل الكائن المنتج. إن قتل الكائن المنتج مهم جداً، لأنه إذا بقي حياً ونشطاً بعد الحصاد فإن هناك احتمالاً ببدء عملية تكسير الكتلة الحيوية لمكامن خزنها الداخلية (الزيت و المثين) بعد إزالة مصدر الكربون خلال عملية الغسل. وإن التكسير الداخلي لــ TAG الفطري بواسطة β Oxidation – سوف لا يقلل إنتاج الزيت فقط ولكنه يؤثر أيضاً وبشكل كبير في نوعية الزيت، ويزيد بشكل كبير من نسبة الفقدان خلال المعالجات.

كانت الزيوت الغنية بـــ ARA هدفاً للعاملين في مجال التقانة الحيوية ولسنين عديدة، وحتى قبل معرفة أهمية ARA في تغذية الأطفال الرضّع. وقد بدأ العمل، قبل أكثر من 40 عاماً مضت، في شركة Unilever في المملكة المتحدة على تشخيص المصادر الجرثومية ذات الزيوت الغنية بـــ ARA، اعتقاداً (وجد أنه كان خاطئاً) بأن ARA هو مولد لنكهة الدجاج. كما كانت هناك محاولات لإنتاج الزيوت الجرثومية الغنية بـــ ARA في اليابان من قبل شركة Lion Corp لاستخدامه كأحد مكوّنات مواد التجميل. لم تنجح أي من المحاولتين، ولكنها مهدت الطريق للتطورت التي حدثت في المستقبل حالما عرفت التطبيقات المهمة للزيت الغني بـــ ARA. ولقد وجد أن العديد من الفطريات الخيطية لها القدرة على إنتاج ARA وأن مسحاً لهذه الفطريات شخّص الفطر *Mortierilla alpina* كونه أكثر الكائنات المنتجة الواعدة. توجد حالياً ثلاث معالجات منفصلة، على الأقل، تستخدم هذا الفطر. إثنتان منها تجريان في الشرق الأقصى (أحدها في اليابان من قبل شركة Suntory Co. Ltd والثانية في الصين من قبل شركة Wuhan Alking Bioengeer Co. Ltd) أما الثالثة فهي في أوروبا الغربية، وأمريكا الشمالية (بواسطة شركة DSM Food Specialities في إيطاليا وقد بيعت بعد ذلك إلى الولايات المتحدة الأمركية بعقد حصري مع شركة Martek Biosciences). من بين هذه المعالجات، فإن التي تجريها DSM هي الأكثر أهمية، حيث إنها تنتج أكثر من 95% من زيوت الخلية المفردة الغنية بـــ ARA المنتجة سنوياً.

زرعت سلالة مسجّلة من *Mrtierella alpina* (تم الحصول عليها بطرق الانتقاء التقليدية لانتقاء سلالة بمواصفات، نمو وإنتاج دهون، مرغوبة، أي لم يتم الحصول عليها باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية – جميع سلالات زيوت الخلية المفردة المستخدمة حالياً غير معدّلة وراثياً) في خزانات تخمير متتابعة الحجم لحد الحصول على حجم نهائي يزيد على 50000 لتر. لغرض الحصول على أعلى كثافة الخلية ممكنة، فقد غُذيّ الخزان بكلٍّ من النتروجين والكربون خلال عملية التخمير. وقد تم حال الحصول على الكثافة اللاخلية المطلوبة إيقاف التغذية

بالنتروجين، لكن التغذية بالكربون استمرت تحت هذه الظروف المحددة للنتروجين حيث لا يستطيع الفطر متابعة النمو، ولكنه يستمر باستخدام الكربون المجهز محولاً إياه إلى دهن مخزون (المنتوج المرغوب) – انظر الشكل (14.16) أيضاً.

حالما تتراكم كمية كافية من الدهن في الكتلة الحيوية للفطر يحصد المرق الزرعي باستخدام الطرد المركزي المستمر أو ضاغطة المرشح (Filter press)، ومن ثم يجفف.

تجمع الكتلة الحيوية الجافة على شكل كريات لتسهل عملية استخلاص الدهن باستخدام الهيكسان. يُعرض الدهن المستخلص إلى البخار لإزالة الهيكسان، ومن ثم يعالج بنفس التقنية المستخدمة في الزيوت النباتية. توصف معالجات الزيت بالاسم المختصر RBD الذي يشير إلى R = Refining (التكرير)، B = Bleaching (القصر) وD = Deodourising (إزالة الرائحة). تعمل هذه المعالجات الثلاث على إزالة الكميات الصغيرة من المكونات اللاخلية الأخرى التي تم استخلاصها مع TAG.

إن الزيت المنتج أصفر اللون (نتجية لوجود بعض الكاروتينات – Caratenoids – الباقية حتى بعد RBD) لماع وذو طعم مقبول ورائحة مميزة. وعلى الرغم من أن الزيت الفطري مقاوم للأكسدة بسبب احتوائه على مواد ضد الأكسدة، إلّا أن مضادات أكسدة إضافية (فيتامين E) يتم إضافتها خلال المعالجات لضمان الحماية الكاملة ضد التأكسد.

زيوت الخلية المفردة الغنية بـــ DHA   DHA – rich SCO

على الرغم من توفر الزيوت الحاوية على DHA من المصادر السمكية (الجدول 3.16) مما يجعل تطوير زيوت الخلية المفردة غير ضروري، إلّا أن احتواء زيت السمك على EPA يعني أنه غير مناسب لإضافته إلى حليب الأطفال الرضّع. لذا استغلت هذه الحقيقة لبدء الإنتاج التجاري لزيوت الخلية المفردة الغنية بالـــ DHA والخالية من EPA. يُعرف عن الأحياء المجهرية البحرية إنتاجها للـــ DHA، وإن بعضها لا ينتج EPA. ويبدو أن تخليق هذين النوعين من PUFA ذات السلاسل الطويلة جداً يكون مرتبطاً بشكل قوي بالبيئة البحرية الباردة (أي، ملوحة عالية).

يمكن استثناء العديد من المجهريات البحرية المنتجة لــ DHA من الاستخدامات التجارية لأنها إما بكتريا (التي لا تراكم كميات كبيرة من TAG) أو أنها كائنات تخليق ضوئي مجبرة (انظر أعلاه). وقد تم تشخيص نوعين من الكائنات حقيقية النواة متشكلة التغذية (Heterotrophic) (بواسطة شركتين منفصلتين في الولايات المتحدة الأمريكية). وتم تطويرها ككائنات منتجة لزيوت الخلية المفردة الغنية بــ DHA (انظر الجدول 3.16 حول تركيبتهما من الأحماض الدهنية). إن كلا الكائنين طحالب مجهرية: أحدهما *Crypthecodinium* طوّر بواسطة شركة *Martek Biosciences*، كولمبيا، MD من المسوطات *(Dinoflagellate)*، أما الثاني *Schizochytrium*، المطور بواسطة Omega Tech Inc., Boulder, Co فيعود إلى الرتبة *Thraustochytriales*. كلاهما ينتج زيتاً غنياً بــ DHA، علماً أن الزيت المنتج من *Schiozochytrium* يحتوي كذلك على حمض آخر من نوع PUFA ذات السلسلة الطويلة جداً وهو *Docosapentaenoic* - (DPA n -6, 20: 5n (6. في عام 2001، اشترت شركة Matrek شركة Omegatech لكي تقوي الخبرة والملكية الفكرية لهاتين الشركتين.

إن الزيت المنتج من *C. cohnii* هو زيت الخلية المفردة (DHASCO) المستخدم في تدعيم حليب الأطفال الرضّع. وهو يكون أكثر من 95% من السوق العالمي لزيوت الخلية المفردة الغنية بــ DHA. تزرع *C. chonii* كما هو موضح في الشكل (17.16)، وإن الصفة الرئيسية لهذه العملية هي الحاجة إلى وسط زرعي ملحي لإنماء هذا الكائنات المجهرية البحرية. إن درجة ملوحة ماء البحر، وهو البيئة الطبيعية لــ *C. cohnii*، عالية جداً لاستخدامها في خزانات التخمير الفولاذية المستعملة في الإنتاج الموسع. لهذا تم تطوير سلالات متأقلمة للنمو في أوساط زرعية قليلة الملوحة (باستخدام تقانات تطوير السلالات التقليدية، مرة أخرى) للسماح بإجراء عمليات الإنتاج التجارية في تراكيز ملحية أقل من التراكيز التي تسبب تأكلاً في خزانات الزرع.

كما في حالة الزيوت الخلية المفردة الغنية بـــ ARA، فحالما تصل مستويات الكتلة الحيوية والزيت في المخمر إلى الحد المطلوب، تفصل الكتلة الحيوية من مرق الزراعة ثم تجفف وبعدها يستخلص الزيت باستخدام الهيكسان. إن زيوت الخلية المفردة الغنية بـــ DHA برتقالية اللون وذات طعم مميز ومقبول. وهي بالتأكيد تفتقد الطعم السمكي غير المرغوب الذي تتصف بها زيوت الأسماك.

6.3.16 سلامة استهلاك زيوت الخلية المفردة Safety of SCOs

بسبب طبيعتها الجديدة، وبما أنها مشتقة من مصادر جرثومية، فيجب تقييم سلامة استهلاك زيوت الخلية المفردة بدقة قبل إطلاقها إلى الأسواق، وخاصة كإضافات إلى حليب الأطفال الرضّع! ونتيجة لذلك، فإن هذه الزيوت قد تكون أكثر الزيوت الغذائية المفحوصة. ولقد أجري عليها العديد من الدراسات السريرية ودراسات السلامة باستخدام نماذج حيوانية ومتطوعين من البشر.

اختبرت هذه الفحوص تأثيرات الجرع الكبيرة المفردة (دراسات السمية المزمنة) في المتطوعين من البشر. لم يلاحظ أي أعراض جانبية أكثر من الإسهال أو التجشؤ ذي الرائحة السمكية بعد إعطاء جرعات كبيرة جداً من الزيت (مساوية إلى حوالى 100 غم للشخص).

7.3.16 مستقبل زيوت الخلية المفردة Future of SCOs

إن جميع زيوت الخلية المفرده التي تنتج في الوقت الراهن تحتوي إما على DHA و/أو ARA وإن معظم المنتوج يستعمل في حليب الأطفال الرضّع. وفي الحقيقية، إن استهلاك خليط DHA/ARA بواسطة شركات تصنيع حليب الأطفال الرضّع، في وقت كتابة هذا الفصل (2005) يعني أن السوق يحدده العرض، وليس الحاجة. ولأجل تصحيح هذه الحالة، فقد تم بناء مصانع جديدة في الولايات المتحدة لإنتاج كلا نوعي الزيوت، الغنية بـــ DHA والغنية بـــ ARA. ولقد أظهرت الدراسات السريرية فعالية الـــ DHA ضد مدى من المؤشرات السريرية تمتد من المستوى العالي للغلسريد الثلاثي Triglyceride في الدم (مؤشر لزيادة مخاطر

النوبات القلبية) إلى التدهور العقلي لكبار السن. ومن المفترض أن توفر هذه المجالات نمواً مستقبلياً لزيوت الخلية المفردة الغنية بـــ DHA حالما يتم تغطية الطلب الحالي على هذه الزيوت وتجاوزه.

يمكن كذلك تطوير PUFA أخرى ذات سلسلة طويلة جداً تطويراً تجارياً في حالة تشخيص الكائن المنتج المناسب. إن أكثر الأحماض الدهنية احتمالاً للتطوير في المستقبل القريب أو المتوسط هو EPA. يبدو أن لهذا الحمض الدهني فعالية ضد الالتهابات، ويمكن استعماله في علاج أمراض المناعة الذاتية مثل مرض الالتهاب المفصلي (Arthritis). كما يبدو كذلك أن الفعالية ضد الالتهابية للـــ EPA تعمل على حماية القلب مقللة من أخطار أمراض القلب. من التطبيقات المثيرة الأخرى للـــ EPA هي معالجة أنواع السرطانات المختلفة والاعتلال العام (Catchexia) والهزال المزمن الذي يرتبط أحياناً بالسرطان والذي يقلل كثيراً من فرص البقاء. علماً، أن التحدي، وفي جميع هذه الحالات، هو قدرة العاملين في التقانة الحيوية على تبيان فوائد زيت الخلية المفردة الحاوي على EPA والغالي الثمن مقارنة بزيت السمك الرخيص الذي يحتوي على EPA كذلك، ولكن الوجود المتزامن للـــ DHA في زيت السمك من غير المحتمل أن يكون أحد المساوئ عند إعطاء مثل هذه الزيوت إلى البالغين.

إن أكبر التهديدات الممكنة لإنتاج زيوت الخلية المفردة هو إنتاج زيوت رخيصة تحتوي على PUFA ذات سلاسل طويلة جداً من مصادر نباتية مهندسة وراثياً. إن جميع الجينات المطلوبة لتخليق هذه الـــ PUFA استنسخت من مصادر جرثومية مختلفة، وعلى الرغم من أن المعضلة التقنية في إعادة تجميع الـــ PUFA ذات السلاسل الطويلة جداً في النبات التي تستطيع عادة تخليق PUFA ذات 18 ذرة كربون فقط، هي مشكلة كبيرة، ولكن من المفترض إمكانية الوصول إلى حل لها.

حتى عند توفر نباتات قادرة على تخليق PUFA ذات سلاسل طويلة جداً من الممكن أن تبقى هناك مقاومة كبيرة لزراعة مثل هذه النباتات المهندسة وراثياً و/أو أكل منتجاتها، من قبل المستهلكين والمهتمين بالبيئة (خاصة في أوروبا). إن

الكلفة المرتفعة لتطوير مثل هذه النباتات المهندسة وراثياً، يتوجب على الشركات التي تجري الأبحاث عليها أن تسوقها من خلال مراعاة السعر العالي لزيت النبات المهندس وراثياً.

باختصار، استغرقت زيوت الخلية المفردة زمناً طويلاً لكي تصبح حقيقة تجارية، وهناك حاجة إلى جهود مستمرة للحفاظ على موقعها في السوق: علماً، أنه في الوقت الحالي والمستقبل القريب، على الأقل، يبدو أن نجاح هذه الزيوت بات مضموناً.

4.16 قراءات إضافية Further reading

Arterburn, L. M., K. D. Boswell, and T. Lawlor [et al.], "In Vitro Genotoxicity Testing of ARASCO and DHASCO Oils," *Food and Chemical Toxicology,* vol. 38 (2000), pp. 971-976.

Cohen, Z. and C. Ratledge, eds. *Single Cell Oils*. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 2005.

Knapp, H. R., N. Salem, and S. Cunnane, "Dietary Fats and Health," *Lipids,* vol. 38 (2003), pp. 297-496 (A collection of key papers and reviews presented at the 5th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids).

Ratledge, C. and J. P. Wynn, "The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms," *Advances in Applied Microbiology,* vol. 51 (2002), pp. 1-51.

Sorger, D. and G. Daum, "Triacylglycerol Biosynthesis in Yeast," *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 61 (2003), pp. 289-299.

Sutherland, I. W. "Biotechnology of Microbial Polysaccharides in Food," in: K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin, eds., *Food Biotechnology*, 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis, 2002, pp. 193-220.

Tombs, M. and S. E. Harding, *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1998.

الفصل السابع عشر

التطبيقات البيئية

Environmental Applications

فيليب فانديفيفر | **Philippe Vandevivere**

مؤسسة مياه البحر، توسان، الولايات المتحدة الأمريكية | **Seawater Foundation, Tuscon, USA**

ويلي فيرستريت | **Willy Verstraete**

جامعة غنت، بلجيكا | **Ghent University, Belgium**

1.17 مقدمة Introduction

حتى زمن قريب احتكرت الهندسة الصحية الأنشطة الصناعية ذات الصلة بالبيئية. لأن الهندسة الصحية المتقدمة تطورت تدريجياً كفرع للهندسة المدنية خلال القرن الماضي، ولقد تم التركيز على تقنيات الهندسة التقليدية التي فيها تجاهل إلى حدٍّ كبير للعنصر الحيوي والتعامل معه عشوائياً وليس ميكانيكياً.

تأسست الهندسة الصحية من أجل:

- استجماع ومعالجة وتوزيع المياه الصالحة للشرب.
- معالجة مياه الصرف.
- معالجة النفايات الصلبة والتخلص منها، على سبيل المثال النفايات البلدية

(Municipal waste)؛ معالجة الغازات المنبعثة من المصانع (Off gases).

العديد من التقنيات التقليدية المستخدمة في الهندسة الصحية هي، مع ذلك، مجرد رسوم توضيحية لقانون Murphy(*) من حيث إنها تحول مشكلة واحدة إلى واحدة أخرى، غالباً ما تكون أكثر تعقيداً، مثل تجريد ملوثات المياه من الهواء أو تركيزه ورميه في التربة . يجب أن تصور الاستراتيجيات البيئية للبيئة "ككل" من منظور طويل الأجل. هذا النهج الشمولي المتكامل يتطلب معرفة تفصيلية للبيولوجيا البيئية، وعلى الأخص، لسير المجتمعات الجرثومية المعقدة. إن التركيز الجديد على البيئة ككل، وعلى سِيَر مفصلة للعنصر الحيوي، قد أدى إلى تطوير أنشطة صناعية جديدة، يشار إليها بـــ "التكنولوجيا الحيوية البيئية"، التي من جلّ مهامها مخاطبة ومعالجة المشاكل البيئية التي تواجه العالم الآن، وأهمها :

- الأمطار الحمضية، واستنفاد الأوزون.
- إغناء المياه الجوفية والسطحية بالمغذيات والمبيدات المعاندة.
- استرداد المنتجات التي يعاد استخدامها والطاقة من النفايات.
- معالجة التربة.
- التخلص من الروث الحيواني.

في حين أن تقنيي الحيوية الصناعيين يستخدمون الكائنات المجهرية واضحة المعالم لصنع منتجات ذات تركيب وجودة يمكن التنبؤ بهما مثل الحمض اللبني، والبيرة، أو الغلوتاميت أحادي الصوديوم، فتقنيو الحيوية الصناعية البيئية، من ناحية أخرى، يبدأون بلقائح سيئة وينتظرون حتى تحدث الظواهر المرغوبة. لذا هناك حاجة إلى عزل وتحديد وتوصيف الكائنات الحية المجهرية التي توجد

(*) قانون مرفي (Murphy law): من السياقات المتعارف عليها في الأدبيات الاجتماعية البريطانية وتعني قانوناً جيد التسطير، ولكنه غير فعّال، أو لا يمكن تطبيقه بالتمام (المترجم).

وتتفاعل في التربة، والوحول المنشطة، والحبيبات اللاهوائية، الخ. وهكذا فقط عندما يصبح من الممكن إعادة تجميع هذه الكائنات المجهرية ومهامها بطريقة يمكن التنبؤ بها سوف تصبح التقانة الحيوية البيئية أكثر قبولاً جماهيرياً. هناك تطويرات جديدة لجهة إدخال الكائنات الحية والجينات في زرعات مختلطة. ولكن، التطبيق العملي لهذه التطورات الجديدة يعاق إلى حدٍّ ما بسبب عدم قدرة الكائنات المجهرية التي أدخلت على البقاء على قيد الحياة، وبسبب القيود التنظيمية على إدخال متعمد للكائنات الحية المحورة في البيئة. وإن القدرات، مع ذلك، هائلة لأن التقدم في مجال البيولوجيا الجزيئية جعل ممكناً الآن بناء جينات جديدة، وأنزيمات جديدة لتحلل المركبات التي لم يمكن، حتى الآن، تحليلها حيوياً (Biodegraded). هذه الجينات الجديدة قد تصبح مدرجة في جينومات مجتمعات الجراثيم القائمة، وهذه العملية تسمى نقل الجينات الأفقي. على سبيل المثال، يمكن إدخال البلازميدات واسعة النطاق في المضائف المتخصصة بتحليل المواد الكيميائية الاصطناعية في مجتمعات التربة الجرثومية، وبالتالي تعزيز قدراتها التحليلية .

2.17 معالجة مياه الصرف Treatment of wastewater

1.2.17 العلاج الهوائي بواسطة نظام الحمأة (الوحل) المنشط

Aerobic treatment by the activated sludge system

العمليـــة الأكثر استخدامـــاً لتنقية مياه الصـــرف هي التحلل البيولوجي اللاهوائي مع نظام الحمأة المنشطة (انظر إلى الاطار 1.17 للتعاريف). تتدفق المياه العادمة من خلال خزان مُهوّى حيث تتمعدن المواد العضوية الذائبة، أي تتأكسد إلى ثاني أكسيد الكربون، والنترات والفوسفات، كما يلي:



الاطار 1.17: معالجة مياه الصرف الصحي: التعاريف

BOD_5 (Biological oxygen demand): الطلب على الأكسجين البيولوجي (بعد خمسة أيام من الحضانة)هي المعلمة التي تحدد كمية تركيز المواد العضوية القابلة للتحلل الموجودة في مياه الصرف الصحي. وهو كمية ال O_2 المستخدمة بواسطة الكائنات الدقيقة لتحلل المادة العضوية في ظروف تجربة مختبرية قياسية.

سوائل الصرف المخلطة (Mixed liquor): تعليق التجمعات الجرثومية (مجاميع صغيرة من الكائنات الحية الدقيقة) في خزان التهوية لمحطة الحمأة المنشطة.

الحمأة (Sludge) : التجمعات الجرثومية في محطة الحمأة المنشطة بعد فصلها عن طافي مياه المجاري المنقاة (Purified effluent) عبر الترسيب في خزان الترسيب.

الحمأة الجسيمة (Bulking sludge): حمأة فيها نمو مفرط للكائنات الحية الدقيقة الخيطية مما يمنع ترسيب التجمعات الجرثومية الضخمة.

النترجة (Nitrification) : التحويل البيوكيميائي للامونيوم إلى نترات التي تنفذها البكتيريا ذاتية التغذية. انها خطوة ضرورية أثناء إزالة النيتروجين البيولوجي في محطات معالجة مياه الصرف، وبعد تمعدن من النيتروجين العضوي إلى الأمونيوم.

إزالة النترجة (Denitrification): التخفيض البيولوجي للنترات إلى N_2 . يحدث عندما يكون O_2 غائباً (ظروف نقص الأكسجين) والمركبات العضوية الموكسدة متوفرة بسهولة.

ناقص الأكسجين (Anoxic) : سائل يكون فيه O_2 غائباً، ولكن أنواعاً أخرى موكسدة مثل النترات أو الحديد تكون موجودة **لاهوائي (Anaerobic) :** سائل يفتقر إلى المواد المؤكسدة، قيمة كمون الخزلدة Redox تحت الصفر، وتأخذ التفاعلات الكيميائية الحيوية مثل التخميرا ت، الحد من الكبريتات، وتوليد الميثان مكانها.

يتم هذا التفاعل في معظمه بواسطة البكتيريا، المتجمعة في كتل ذات 0.1 ملم قطراً. بعد زمن تفاعل لعدة ساعات (كما في المجاري البلدية) ويصل إلى عدة أيام (في نفايات صناعية سائلة أكثر تركيزاً)، تتدفق السوائل المعالجة مع البكتريا عبر خزان الترسيب، حيث يتم فصل المجاميع البكتيرية بواسطة الجاذبية فتنفصل عن النفايات السائلة النظيفة (الشكل 1.17)، وينبغي على تركيز مجاميع البكتريا في خزان التهوية أن لا يتجاوز 14 غرام/لتر من أجل ضمان استقرار سليم. مجاميع البكتريا

المستقرة (تسمى الحمأة) يعاد حقنها جزئياً في خزان التهوية، وتهدر جزئياً. ويعتمد الأداء الجيد على الاختيار الصحيح لمعدل التحميل الحجمي، الذي ينبغي أن يقع في نطاق 1،0 – 5 غرام BOD5 لكل لتر من سوائل الصرف المخلطة يومياً من أجل ضمان تشكيل سليم للحمأة والحصول على إزالة 90+ ٪ من المواد العضوية الذائبة، باعتبار أن ساكناً واحداً ينتج معدل 30 غراماً BOD5 يومياً، مع ذروة من 100 غرام في اليوم الواحد، وتصمّم هذه الخزانات المهواة (Aerated tanks) للحصول على 100 لتر من سوائل الصرف المخلطة (Mixed liquor) لكل ساكن (Individual).

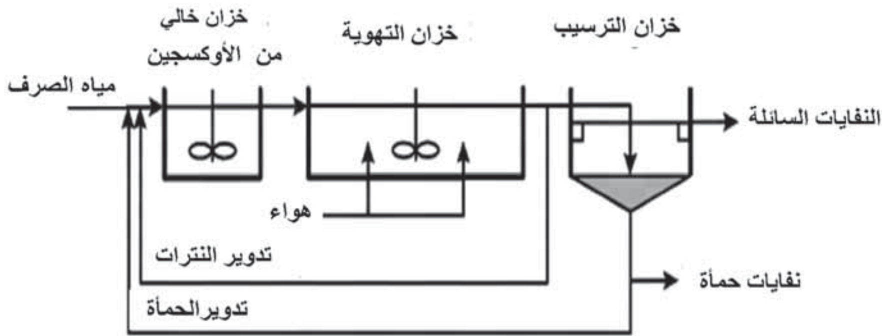
إن الميزة الأساسية لعملية الحمأة المنشطة، نسبة إلى أنواع أخرى من العلاج، هي نوعية طافي مياه الصرف (Effluent) الجيدة، مع BOD5 قليل (20< ملغ/ ل) وقليل من المغذيات (15< ملغ/ ليتر) المتبقية بعد المعالجة. وتعاني هذه العملية، مع ذلك، عدداً من السلبيات (الجدول 1.17) .

الجدول 1.17: مقارنة عمليات مختلفة لمعالجة مياه الصرف الصحي. توفر أنظمة الحمأة المنشطة نوعية جيدة من طافي مياه الصرف، ولكنها تعاني عدة عيوب . وتحقق المفاعلات الحيوية الغشائية نفس جودة الطافي في منشآت أصغر بكثير، وتنتج حمأة أقل بكثير وتقدم المفاعلات UASB ميزة إضافية وهي نفقات الطاقة الصغيرة (لا توجد تهوية)، ولكنها أقل كفاءة من حيث إزالة المواد الغذائية وإزالة الـــ BOD_5.

	المعالجة الهوائية		اللاهوائية
	الحمأة المنشطة	MBR[أ]	UASB[ب]
BOD متبقية	قليلة	منخفض جداً	عالية
N,Pمتبقية	قليلة	قليلة	عالية
إنتاج الحمأة	عالية	منخفضة جداً	منخفضة جداً
الطاقة	مرتفعة	مرتفعة	منخفضة
مساحة الأرضية	كبيرة	صغيرة جداً	صغيرة جداً
الموثوقية	كبيرة جداً	قوية	تعويم الحبيبة

(أ) MBR، مفاعل الغشاء الحيوي (membrane bioreactor).

(ب) UASB، مفاعل غطاء الحمأة اللاهوائية ذات الدفق الصاعد (upflow anaerobic sludge blanket reactor).

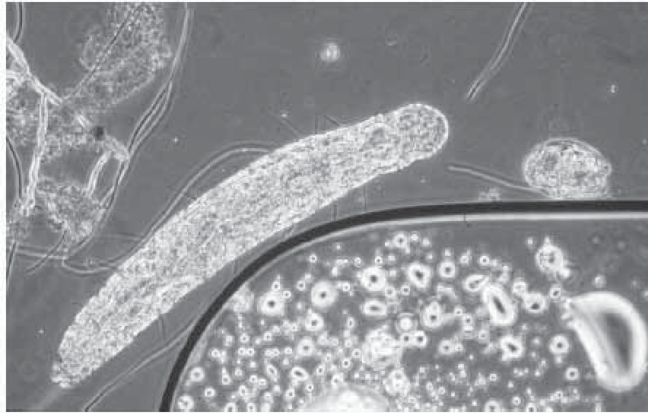


الشكل 1.17: مخطط عملية سريان لمصنع الحمأة المنشطة مع إزالة النيتروجين الحيوي. ولأن الخزان الأول ناقص الأكسجين (Anoxic)، لذلك تستخدم الكائنات الدقيقة النترات لأكسدة المواد العضوية وتحويلها إلى غاز ثاني أكسيد الكربون والأمونيا، وبالتالي خفض النترات إلى نتروجين (N_2) بطريقة نزع النتروجين :Denitrification . في خزان التهوية اللاحق، تتأكسد المواد العضوية المتبقية مع الـــ O_2 كمتقبل للإلكترون . وفي الوقت عينه، يتأكسد الأمونيوم إلى نترات (نترتة :Nitrification)، التي يعاد تدويرها إلى خزان لاهوائي. يتم فصل الكائنات المجهرية من طافي مياه الصرف النظيفة في خزان الترسيب.

إن العائق الاكبر في معالجة مياه الصرف الصحي هو الإنتاج الكبير من الحمأة الزائدة، لأن كل كيلوغرام من الـــ BOD_5 ينتج حوالى 0.3 كغم من مواد الحمأة الصلبة الزائدة . وعادة ما يتم معالجة هذه الحمأة الزائدة في مهضمات لاهوائية، حيث تستقر وتجفف، وأخيراً يتخلص منها كسماد عضوي ينشر على أراضٍ زراعية، أو يُطمر. إن التخلص من الحمأة على الأرض أو في مطامر النفايات، على أية حال، أصبح مقيداً على نحو متزايد في أوروبا، والتخلص من الحمأة أصبح مشكلة.

يمكن لإنتاج الحمأة الزائدة أن يتراجع إلى حد ما بتضمين مواد ناقلة في خزان التهوية . في مثل هذه المفاعلات، لا تشكل الكائنات الحية الدقيقة مجاميع معلقة، كما في نظام الحمأة المنشطة، ولكنها تشكل بدلاً من ذلك أغشية على سطح المواد الحاملة. وقد تتراكم لتكوين ترسبات صلبة أشبه بالحجارة، وفي هذه الحالة يسمى خزان التهوية بالمرشح الوشلي (Trickling filter)، أو تتكون حبيبات

رمل ناعمة، كما هو الحال في مفاعلات الحوض المسيل (Fluidised). إن هذه المتغيرات لعملية الحمأة المنشطة تنتج حمأة أقل لأن الكائنات المجهرية المرافقة تبقى لفترة أطول في خزان التهوية حيث يحدث انحلال ذاتي، مما يقلل الحاجة إلى خزان الترسيب (Settling tank). هذا وقد لوحظ مؤخراً أن إنتاج الحمأة الزائدة في محطات معالجة مياه الصرف يتراجع في بعض الأحيان بشكل كبير وخلال فترات تطول لبضعة أسابيع. ويبدو أن هذه الفترات تتوافق مع النمو المتقطع للديدان الصغيرة *(Nais elinguis)* التي تتغذى على تجمعات الحمأة (الشكل 2.17). فإذا نجحت المحاولات الجارية لضمان استمرار وجود هذه الديدان في سوائل الصرف المخلطة (Mixed liqure)، فإنها ستوفر حلاً أنيقاً جداً وبسيطاً لمشكلة التخلص من الحمأة الزائدة.



الشكل 2.17: مجاميع من الكائنات الحية المجهرية معلقة في سوائل الصرف المخلطة لخزانات الحمأة المنشطة. لاحظ وجود دودة *(Nais elinguis)*، التي تتغذى على هذه التجمعات. قد تقدم هذه الديدان حلاً بسيطاً جداً وأنيقاً لمشكلة التخلص من الحمأة (الصورة تقدمة من البروفسور ايكلبوم Eikelboom)

ولعل إنجازاً مهماً من حيث إنتاج الحمأة الزائدة كان قد تحقق في المفاعل الحيوي الغشائي (Membrane bioreactor) أو (MBR). في مفاعل MBR، يتم استبدال خزان الترسيب بواسطة وحدة ترشيح ميكروية تفصل الكائنات المجهرية من طافي الصرف السائل المعالج (Treated effluent) . في مثل هذا النظام، يمكن

إعادة تدوير الحمأة المفصولة إلى أجل غير مسمى تقريباً في خزان التهوية، وتحت هذه الظروف، يصبح عمر الحمأة طويل جداً أيضاً، وإنتاج الحمأة الفائضة منخفضاً جداً (<0.1 كيلوغرام/ كيلوغرام BODs مزال). والميزة الرئيسية الثانية للـــ MBR هي أن الوصول إلى تركيز حمأة عالٍ جداً (يصل إلى 30 غراماً/ لتر)، الذي يسمح باستخدام معدلات تحميل حجمية أكبر بكثير من نظام الحمأة المنشطة. ونتيجة لذلك، يمكن بناء منشآت MBR مضغوطة للغاية على جزء صغير من المساحة المطلوبة من قبل محطة الحمأة المنشطة. هذه البصمة الصغيرة جذابة جداً للصناعات التي تنتج مياه صرف مركز (BOD_5>2-3 g/l).

2.2.17 المعالجة اللاهوائية لمياه الصرف

Anaerobic treatment of wastewater

حتى زمن قريب، كان الهضم اللاهوائي يطبق فقط لتحقيق استقرار الملاط العضوي المركز (Concentrated organic slurries) مثل الأسمدة الحيوانية ونفايات حمأة مياه الصرف الصحي. وكان الإجماع على أن المعالجة اللاهوائية بطيئة، إذ هي لا تزيل أكثر من 50 ٪ من الحمل العضوي. وعلاوة على ذلك، تتطلب درجات حرارة عالية، لذا لا يمكن الاعتماد عليها . ولكن هذه النظرة تغيرت بشكل كبير خلال العقدين الماضيين وأصبح الهضم اللاهوائي الآن التقنية المعتمدة للمعالجة السريعة لمياه الصرف. ومن خلال استخدام الحمأة الحبيبية اللاهوائية أمكن تحقيق تركيزات كتلة حيوية عالية جداً في المفاعلات (50 غرام/لتر)، سامحة باستخدام معدلات تحميل حجمي عالية جداً (BOD_5 20g/لتر مفاعل في اليوم). إن تصاميم المفاعلات الجديدة التي تحسن النقل الجماعي للمؤيضات (Metabolites) في الحمأة الحبيبية الآن تجعل من الممكن معالجة مياه الصرف من أية تركيبة كانت تقريباً (0.3 – 100g BOD_5/L) على مدى حراري يتراوح بين 10-55 درجة مئوية وبطريقة موثوقة.

إن التحول اللاهوائي للمركبات العضوية لإنتاج الغاز الحيوي (Biogas) هي عملية متدرجة تعمل خلالها مجموعات مختلفة من البكتيريا بالتسلسل لتحليل المواد الأولية بالكامل، وكالآتي:

- تحميض بالتحلل المائي (Hydrolytic acidogens) : تقطع البوليمرات إلى أحماض دهنية قصيرة السلسلة؛
- أستلة التغذية المتزامنة (Syntrophic acetogens) : تحطم الأحماض الدهنية إلى أسيتات و H_2؛
- التحول إلى ميثان (Methanogens) : تحول الأسيتات و H2 إلى CH4 وCO2 (الغاز الحيوي).

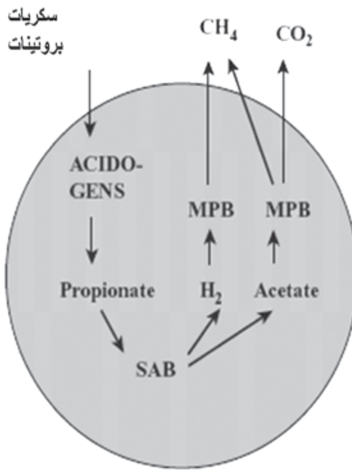
وتعتمد آخر مجموعتين عادة على بعضها البعض تماماً (بسبب نقل H2)، وبالتالي يشار إليها باسم جمعية الميثان. (Methane association) ومما يعزز الأيض لديها بشكل كبير زراعة الحمأة اللاهوائية على شكل حبيبات مكتظة تسهل نقل H_2 وغيرها من منتجات التحلل الوسيطة (الشكل 3.17). إن فهم الاغتذاء التعابري أو المتزامن (Syncrophism)، حيث تتمكن الكائنات المجهرية اللاهوائية عادة من تقاسم الطاقة المتاحة أثناء التحويل البيولوجي للجزيء إلى CH_4 و CO_2 وبالتالي يمكن تحقيق التفاعلات الوسيطة الماصة للطاقة تحت الظروف القياسية، ولقد افترض أن كم الطاقة الأدنى للحياة حوالى (21 kJ/mol-) كناتج مكون أو محول . أن تطبيق مفهوم الحد الأدنى من الطاقة لتخمير البروبيونات إلى غاز الميثان يوحي بأن كلا الــ Syntrophs يجب أن يعملا في منطقة ضيقة جداً من الضغط الجزئي لــ H_2، pH_2 (الشكل 4.17).

إن تحويل مول واحد من البروبيونات ينتج 21 kJ < فقط عندما يكون ($pH2<10^{-5.4}$ atm)، في حين أن قيمة pH_2 الدنيا تسمح بإنتاج مول واحد من غاز ميثان لتوليد 21 kJ- وهو أيضاً في نطاق 10^{-5} atm . وهذا فقط عندما تقع pH_2 حول 10^{-5} atm حيث يحتمل حصول تحويل متسلسل من بروبيونات إلى أسيتات، والأسيتات إلى غاز الميثان. ويمكن استخلاص استنتاجات مماثلة لتحويل البوتيرات (Butyrate) إلى غاز الميثان، وكذلك مع الفورمات (Formate) بدلاً من H_2 كمتوسط . إن فهم طبيعة التعايش بين الكائنات الحية متزامنه التغذية

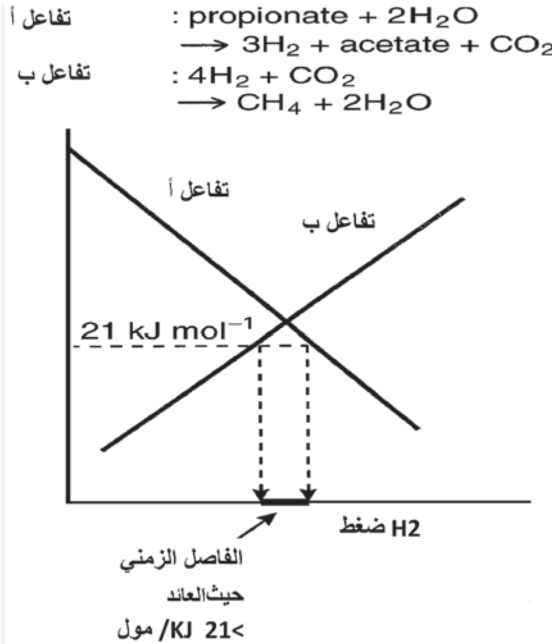
(Syntrophic) هي مهمة صعبة وضرورية لتعظيم الاستفادة من التكنولوجيا الحيوية اللاهوائية. وإن معظم المفاعلات اللاهوائية لمعالجة مياه الصرف هي مفاعلات حمأة بطانية لاهوائية (Upflow anaerobic sludge blanket) بدفق صاعد (Upflow)، أو (UASB، الشكل 5.17). وفيها تدخل مياه الصرف المفاعل في الجزء السفلي عبر نظام توزيع مصمّم خصيصاً. وتتدفق في زمن لاحق من خلال قرار حمأة (Sludge bed) يتكون من البكتيريا اللاهوائية المتنامية في شكل حبيبات تستقر بشكل جيد للغاية (60-80 m/h). ويتم فصل خليط من الغاز الحيوي، والحمأة، والماء في فاصل من ثلاث مراحل يقع في الجزء العلوي من المفاعل.

المميزات الرئيسية للمعالجة اللاهوائية لمياه الصرف مقارنة بالمعالجة الهوائية هي إنتاج حمأة صغيرة ($0.1\ kg/kg\ BOD_5$)، والاستهلاك المنخفض للطاقة، حيث لا يلزم تهوية، والمساحة الأرضية الصغيرة، عادة 0.01 متر مربع لكل فرد مقارنة بـــ 0.05 متر مربع لمحطات الحمأة المنشطة (الجدول 1.17). علاوة على ذلك، يتم استرداد الطاقة في شكل من أشكال الغاز الحيوي ($0.35\ L\ methane/g\ BOD_5$).

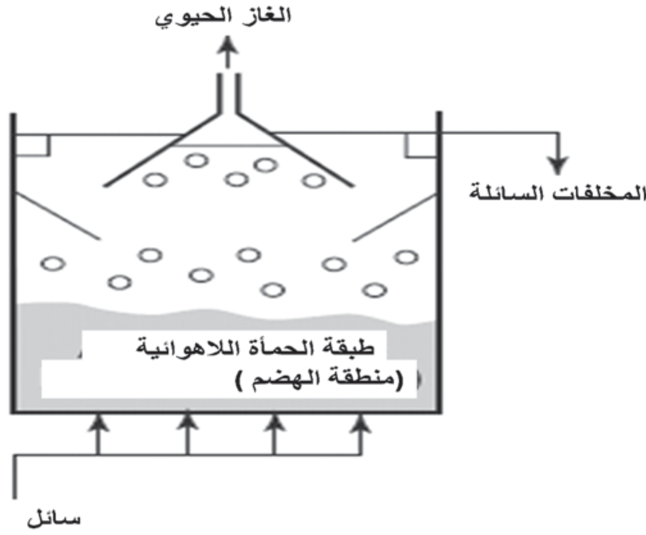
إن معدل إزالة BOD في المفاعلات اللاهوائية يسقط بشكل ملحوظ إلى أقل من $20^{\circ}C$ ودرجة الحرارة المثالية هي حوالى 35 C . وهذا يفسّر سبب أن أول تطبيق مفاعلات UASB كان في المناطق الاستوائية منذ حوالى 20 عاماً. ففي المناطق المعتدلة، استخدمت مفاعلات UASB فقط لمعالجة مياه الصرف المركزة ($> 2g\ BOD_5/L$) حيث يمكن استخدام إنتاج الغاز الحيوي الكبير في عملية إحماء المفاعل. وقد تم مؤخراً تصميم مفاعل جديد يسمح بتحقيق نمو بمعدلات مرتفعة بما فيه الكفاية حتى على $10\ ^{\circ}C$. وهذا ما يسمى مفاعل موسع غطاء الحمأة الحبيبية (Expanded granulated sludge blanket) (EGSB) لتعظيم معدلات نقل المغذيات الجماعي مع خلط هيدروليكي أكثر كثافة، ويجعل من الممكن معالجة مياه الصرف الصحي لاهوائياً حتى في المناطق المعتدلة.



الشكل 3.17: سلسلة من التفاعلات الكيميائية الحيوية التي تجري في حبيبة حمأة لاهوائية، على سبيل المثال في مفاعل غطاء الحمأة اللاهوائية الصاعدة لمعالجة مياه الصرف. إن تسلسل التفاعلات من منظار الديناميكا الحرارية ملائمة إلا في نطاق ضيق من ضغوط جزئية pH_2 منخفضة جداً. البكتيريا ***Acetogenic*** والمنتجة للمثيان ***Methanogenic*** معاً في حبيبة معبأة يجعل نقل H_2 تحت ضغوط جزئية منخفضة أكثر كفاءة. SAB: البكتريا المنتجة للخلات. MPB: البكتيريا المنتجة للميثان .



الشكل 4.17: تأثير الضغط الجزئي لـ H_2 في الطاقة الحرة لتحويل البروبيونات بواسطة البكتريا المنتجة للخلات (تفاعل أ) وللتحول اللاحق بواسطة البكتريا المنتجة للميثان من H_2 إلى غاز الميثان (تفاعل ب). فقط في نطاق ضيق جداً من الضغط الجزئي لـ H_2 (حوالى 10^{-5} atm) هي تفاعلات إيجابية من منظار الديناميكا الحرارية، أي أنهما ينتجان سوية ما مقداره > 21kJ/mol) من المواد المتحولة.



الشكل 5.17: رسم تخطيطي لمفاعل غطاء حمأة لاهوائي صاعد (UASB) مستخدم على نطاق واسع في المناطق المعتدلة لمعالجة مياه الصرف المركزة وكذلك لمعالجة مياه الصرف الصحي (مياه الصرف المخففة) في المناطق الاستوائية.

أما العيب الرئيسي للهضم اللاهوائي فهو أنه يزيل أجزاء ضئيلة فقط من المواد الغذائية (N, P)، ويرجع ذلك إلى إنتاج حمأة زائدة. ولذلك فمن الضروري تطبيق خطوة المعالجة-اللاحقة (Post-treatment) من أجل إزالة المزيد من هذه المواد الغذائية، على سبيل المثال عبر تسلسل النترجة / إزالة النترجة.

وخطوة المعالجة-اللاحقة الهوائية خطوة ضرورية أيضاً لإزالة بقايا BOD_5 المتبقية في طافي نفايات UASB السائلة، لأن البكتيريا اللاهوائية لا تقتنص بسهولة مواد موجودة بتركيز أقل من 50 ملغ / لتر في حين أن البكتيريا الهوائية تتمكن بسهولة من خفض BOD إلى أقل من 10 ملغ / لتر . إن حقيقة كون النترجة تتطلب تهوية مكلفة، وإن نزع النترجة يتطلب مواد عضوية مؤكسدة (التي تدهورت في الخطوة قبل- اللاهوائية !) حفزت البحث عن أنواع بديلة من المعالجات اللاحقة. وثمة بديل مثير للاهتمام، وهو حالياً قيد التطوير، ويستخدم تفاعل Anammox (أكسدة الأمونيوم لاهوائياً)؛ فقد وجد أن NH_4^{+4} يتأكسد لا هوائياً إلى N_2 بوجود NO_2^- وفقاً لما يلي:



$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -358\,\text{kJ per mol of } NH_4^+$$

وهكذا عن طريق تقسيم طافي المخلفات السائلة اللاهوائية المحملة بالأمونيوم إلى قسمين: نترتة جزئية تتحول إلى نتريت، ثم تمزج مجدداً في مفاعل حيث تفاعل Anammox يحدث بدون الحاجة إلى، تهوية وبدون إضافة مواد عضوية مؤكسدة. إن التطبيق كامل النطاق لتفاعل Anammox يفتح أبواباً جديدة لعملية الهضم اللاهوائية لأنه سيمكن تتابعاً متماسكاً من الكربون العضوي إلى غاز الميثان والنيتروجين العضوي عبر الأمونيوم والنتريت إلى N_2. وباستخدام هذا السيناريو، يمكن أن يعالج لاهوائياً حتى مياه الصرف الغنية N بتكلفة منخفضة .

المعالجة اللاهوائية المباشرة لمياه الصرف الصحي المنزلي، إما في المجاري أو في المصانع متواضعة رأس المال اللاهوائية – الهوائية المشتركة تجذب فقط اهتمام الصناعة البيئية شريطة أن تُعوّض هوامش الربح الكافي. وبالتالي، فإن التحدي يكمن في تحديد الفرص المتاحة في المعالجة اللاهوائية لمياه المجاري لهندسةالقيمة المضافة العالية. أدناه مناقشة لاحتمالين.

تطوير حمأة مهندسة حبيبية لاهوائية (حفاز بيولوجي)

Development of engineered anaerobic granulated sludges (biocatalyst)

إن بعض المركبات العضوية التي تنتجها الصناعات الكيماوية وذات الطبيعة الحيوية الدخيلة (Xenobiotics) لا تتحلل في أجهزة الهضم اللاهوائية أو الهوائية، ولكنها تتحلل خلال معالجة متتابعة لاهوائية/هوائية . ومثالها المركبات العضوية مع بدائل الهالة، والنيترو أو الأزو التي قد تستغرق عدة أشهر، وحتى سنة في بعض الحالات قبل أن تصبح الحمأة مكيفه لهذه المركبات. وهذا هو الزمن اللازم لتطوير أو لغزو أنواع الكائنات الحية الضرورية لتحليل المواد تماماً، وغالباً ما تتطلب المواد الصناعية المعقدة أكثر من نوع جرثومي واحد لتتمعدن تماماً.

ومن الخيارات المتاحة لتسريع التحلل البيولوجي للمواد الصناعية المعقدة هو تلقيح المفاعلات بسلالات بكتيرية جاهزه مناسبة. وقد نجح ذلك مع سلالات

قادرة على نزع الكلور من الكلوروبنزوات أو خماسي الكلوروفينول (Pentochlorophenol). وظهر أن اللقائح استعمرت المفاعل على مدى طويل وأمكن الحصول على تحلل سريع للكلوروبنزوات وخماسي الكلوروفينول. ولأن التكيف للإئتلاف بين السلالات ربما يستند أيضاً إلى أساس انتشار البلازميدات الصحيحة، وهذا يجعل الحاجة مهمة إلى فهم أفضل للتطور الجيني، ونقل البلازميد وتفاعل الكائنات في الجماعات اللاهوائية التي تتناول المعقدات العضوية. وفائدة أخرى محتملة متصلة بتوافر واسع النطاق لاتحادات متخصصة من الجراثيم هي تغيير المسار البيوكيميائي، أي استحثاث مسارات بيوكيميائية مرغوب فيها، كما في حالة تحلل الأمينات الأولية كريهة الرائحة، وأكسدة الأمونيوم اللاهوائية أو تكوين الأسيتو المتجانس (Homo-acetogenesis).

تطوير مضافات تحسين الأداء

Development of performance – enhancing additives

يتسم استبقاء الكتلة الحيوية من خلال التحبيب (Granulation) الكافي بأهمية قصوى في مجال تكنولوجيا UASB، أولاً من أجل الحصول على نوعية طافي مياه صرف جيداً، وثانياً، من أجل ضمان حدٍّ أدنى من زمن المكوث الخلوي يراوح بين 7 إلى 12 يوماً، وهو الزمن اللازم لتجنب فقد البكتيريا اللاهوائية ذات النمو الأبطأ. وإحدى الطرق لتجهيز نمو حبيبي جيد تتم بإضافة البوليمرات والطين أو مواد الشد السطحي، التي يكون لها تأثير فيزيائي - كيميائي في تكوين الحبيبة . وطريقة أخرى تتم بتوفير المغذيات المناسبة، مثل السكريات، التي تحفز نمو الكائنات المجهريه التي تربط الحبيبات اللاهوائية مع بعضها البعض من خلال إنتاج البوليمرات الخارج خلوية (Extracellular) لذلك يبدو من المفيد، من أجل جعل تكنولوجيا UASB أكثر موثوقية، تطوير مضافات داعمة للحياة قادرة على الحفاظ على الحمأة الحبيبية في حالة سليمة، في فترات البدء، أو فترات إدخال مياه صرف منخفضة الجودة .

3.2.17 إعادة تدوير المياه Water recycling

في ضوء نقص المياه المتزايد عالمياً، سيكون، استعمال مياه الصرف المعالجة (Reclaimed waste water) مسألة اهتمام متزايد في العقد القادم. وبما أن ثلثي الاستهلاك العالمي من المياه يستخدم لري الأراضي الزراعية فهناك العديد من الحالات في الدول النامية يتم فيها إعادة استخدام مياه الصرف الصحي المنزلي الخام، للمدن الكبيرة جداً، وبصورة مباشرة في ري المحاصيل الغذائية. مثل هذا النظام مغلق الحلقة يعزز إمكانية تلوث المحاصيل الغذائية بالفيروسات المسببة للأمراض، أو بالبريونات (Prions)، ما يشكل تحدياً كبيراً في التوصل إلى تقنيات غير مكلفة لإنتاج مياه ري آمنة صحياً بدون إزالة الأسمدة N وP. وفي هذا الصدد، يوفر الهضم اللاهوائي إمكانيات معينة، قد تكون أكثر فائدة.

المستهلك الرئيسي الثاني للمياه هو الصناعة، مثل قطاعات المواد الغذائية والمعادن والمنسوجات والورق. وهذه القطاعات تقوم حالياً بتطوير أنظمة معالجة جديدة تمكّنها من إعادة تدوير مياه الصرف خاصة بها في نظام الحلقة المغلقة. وعادة، يتم استخدام سلسلة من العمليات المعيارية التي تنتج مياه معالجة عالية النوعية. تجمع السلسلة عادة بين المعالجات البيولوجية مع معالجات تكميلية نهائية فيزيائية كيميائية. فعلى سبيل المثال، يستخدم مصنع رقائق البطاطس نظاماً يتألف من عملية معالجة لاهوائية وهوائية مع نظام للترشيح العميق (Deep-bed filtration)، والتطهير باستخدام غاز الأوزون والتناضح العكسي. إن مثل هذا النظام المعقد ضروري لتحقيق الإزالة الكاملة للكربوهيدرات، ومبيدات الأعشاب المضادة للتبرعم (Antisprout herbicides) والكائنات المجهرية.

إن صنع طن واحد من الفولاذ يتطلب 280 طناً من المياه . قد واجهت الجهود الرامية إلى إعادة تدوير هذه المياه في محطات فحم الكوك عبرمعالجة الحمأة المنشطة بتسمم الحمأة السريع عندما أُعيد استخدام أكثر من 50 ٪ من المياه المعالجة. ويعزا ذلك إلى تراكم المركبات العضوية السامة ما يشير إلى ضرورة البحث المتأني على المواد العضوية المتبقية، وحتى على المنتجات الجرثومية

المؤدية إلى عمليات أيض ملغومة. ويقوم العديد من مصانع النسيج الرطب حالياً بتحسين أنظمة معالجة مياه الصرف فيها من أجل إعادة تدوير المياه. وبسبب تركيب النفايات السائلة الكيميائي المتغير بشكل مستمر، وبحسب أنواع الأقمشة والأصباغ التي تستخدمها، ليس هناك مصنعا نسيج اثنان يطبقان مخطط المعالجة ذاته لمعالجة المخلفات السائلة (الشكل 6.17) .



الشكل 6.17: يوضح مخطط السيرورة هذا أحدث تكنولوجيا مستخدمة في صناعة الغزل والنسيج لتحويل كميات كبيرة من مياه الصرف إلى مياه معالجة عالية الجودة تستعمل في الغسيل، والجلي، والتبييض، والصباغة والطباعة. تم في هذه التكنولوجيا دمج المعالجات البيولوجية مع المعالجات الفيزيائية والكيميائية من أجل تحقيق النقاوة المطلوبة. واعتمدت خطوة الترشيح البيولوجي النهائية على الكربون المنشط، لتجمع بين الادمصاص المادي مع التحلل البيولوجي في الموضع *(In situ)*، وهي خطوات ضرورية لإزالة المركبات السامة الناتجة أثناء خطوة التطهير بالأوزون (Ozonisation).

4.2.17 أتمتة محطات معالجة مياه الصرف

Automatisation of wastewater treatment plant

يتم في الزمن الحاضر، تشغيل معظم النظم البيولوجية لمعالجة النفايات، وحتى في المحطات الضخمة باهظة الكلفة، اعتماداً على ثلّة من العوامل المادية البدائية، مثل الرقم الهيدروجيني والأكسجين الذائب (DO) أو كامن التأكسد/لاختزال

(Redox potential). وتستخدم مجسات الأكسجين المذاب في محطات الحمأة المنشطة لتقليل استهلاك الطاقة بما يكفي للحفاظ على مستوى DO يقارب 2 ملغ/ لتر في حوض التهوية. وتستخدم مجسّات كمون الأكسدة/الاختزال لرصد أكسدة الأمونيوم وإزالة النترات في مفاعلات الدفعة التسلسلية. ولكن، استراتيجيات السيطرة هذه فشلت في ضمان جودة مخلفات سائلة ثابتة، لأنها لا تكشف الاختلافات في التحميل، والمواد السامة أو أداء العملية . لذلك يجب أن تستكمل استراتيجيات المراقبة الحالية بنماذج حسابية ديناميةة، أي نماذج تحاكي وتتوقع الردود العابرة مما يوفر استراتيجيات تحكم آلية مرنة . إن استخدام النماذج الدينامية يتطلب إسهاماً مستمراً من البيانات المجمعة التلقائية (On line) بواسطة أجهزة الاستشعار.

يجري حالياً تطوير أجهزة الرصد البيولوجي لتجهيز البيانات الفوري (On-line) القادرة على قياس الحمولة ونوعية المخلّفات السائلة الواردة، ونقل هذه المعلومات بشكل مستمر إلى نظام رقابة التشغيل. وهنالك جهاز استشعار بيولوجي فوري الأداء مطوّر حديثاً يقيس BOD في مياه الصرف الواردة، وسمّيّتها المحتملة تجاه مجموعات مختلفة من الكائنات المجهرية الموجودة في الحمأة المنشطة (الشكل 7.17).

إن تطوير أنواع أخرى من أجهزة الاستشعار سيساعد في ضمان وجود نشاط بيولوجي أكثر استقراراً، وبالتالي معالجة أكثر موثوقية. على سبيل المثال، ذكر أعلاه أن الظهور العرضي للديدان الصغيرة في محطات الحمأة المنشطة كان مفيداً لخفض إنتاج الحمأة (الشكل 2.17) إلا أن هذه الديدان، مع ذلك، تختفي لسبب غير مفهوم بقدر ما تظهر، ويستتبعه أداء عملية، متغير جداً. يمكن لأجهزة الاستشعار الفورية الأداء القادر على توقع الحجم السكاني لهذه الديدان، وتساعد على الحفاظ على نشاطها المربح. ويمكن استخدام نفس الاستراتيجية لتحقيق استقرار سكاني من الكائنات المجهرية الأخرى، مثل البروتوزوا التي تأكل البكتيريا (Bactrivorous)، التي هي ضرورية للحصول على نوعية جيدة من النفايات السائلة، أو لإظهار تطور الكائنات المجهرية الضارة، مثل البكتيريا الخيطية التي تسبب الحمأة الجسيمة (Sludge bulking).

3.17 هضم الملاط العضوي Digestion of organic slurries

إن إنتاج الملاط العضوي، ومثاله حمأة الصرف الصحي، أو روث الحيوانات، آخذ في الازدياد في أجزاء كثيرة من العالم مسبباً إشباعاً في تطبيق خطط التخلص التقليدية، مثل نشرها على الأراضي الزراعية. ويحظر عدد متزايد من البلدان مخططات التخلص هذه بسبب تلوث المياه الجوفية. إلا أن عمليات معالجة الملاط العضوي تعاني التكلفة العالية و / أو ضعف الكفاءة.

وعملية العلاج المعروفة لحمأة مياه الصرف الصحي والأسمدة الحيوانية هي عملية الهضم اللاهوائي في مفاعلات لاهوائية مختلطة. يتم أثناء هذه العملية، تحويل نحو 50 ٪ من المواد الصلبة لإنتاج الغاز الحيوي، فيما يكون الباقي بشكل أو آخر مستقراً. ويمكن زيادة الأداء والربحية وإنتاج الغاز الحيوي في أجهزة الهضم اللاهوائية بواسطة هضم السماد الحيواني أو حمأة الصرف الصحي بالمشاركة مع 10-20٪ من النفايات الصلبة من الصناعة الزراعية والغذائية، مثل نفايات المسالخ، و النفايات الصيدلانية، والطبخ، والتخمير أو النفايات البلدية. ومؤخراً بُنِيَ العديد من المنشآت الواسعة النطاق التي تستخدم نهج الهضم المشترك في عدة بلدان أوروبية.

يتم تشغيل المفاعلات المختلطة التي تعالج الملاط العضوي في معدلات تحميل حجمية منخفضة، أي 2-5 كغم عضويات/متر مكعب/يوم لأنه يجب أن تكون الجسيمات العضوية مذابة قبل أن يتم إخضاعها للتحويلات اللاهوائية (الجدول 2.17). وقد يكون معدل ذوبان الجسيمات العضوية بطيئاً كما في حالة نفايات الحمأة المنشطة، التي تستغرق 15 يوماً لتصل إلى 90 ٪ تحلل مائي. ونتيجة لذلك تستخدم أوقات استبقاء (Retention times) لا تقل عن 20 يوماً وقد تصل إلى 60 يوماً، أو أكثر. وهناك تطورات جديدة عديدة تزيد أداء أجهزة الهضم اللاهوائية. منها، فك ارتباط زمن الاستبقاء الهيدروليكي عن زمن الاستبقاء الصلب، عن طريق ترشيح طافي مياه الصرف المعالج، وإعادة ضخّ المواد الصلبة في المفاعل، حتى تمر منتجات التحلل المائي عبر الغشاء . وهكذا يزيل تصميم المفاعل هذا نسبة أكبر من المواد الصلبة، نظراً إلى زمن الاستبقاء الصلب الأطول، ويحقق هذا في مفاعل أصغر (أرخص)، وذلك بسبب زمن الاستبقاء الهيدروليكي الأصغر.

يمكن أيضاً تحسين الأداء عن طريق تشغيل عملية الهضم في درجات حرارة أعلى، نظراً إلى أن معدل التحلل المائي للمواد الجسيمية يزيد مع درجة الحرارة. ولقد أدت رؤى جديدة في الهضم المحب للحرارة إلى بناء عدة أجهزة من هذا النوع لمعالجة السماد الزراعي في الدنمارك . ولأن تشغيلها يتم على درجات حرارة أعلى، فإن هذه المفاعلات تسفر عن نفايات سائلة خالية من الممرضات، خلافاً لأجهزة الهضم متوسطة الحرارة التي كثيراً ما تفشل في تنقية الأنظمة من الممرضات البرازية (الشكل 8.17). ولقد أبقت سلبيات عدة، في الماضي، على الهضم المحب للحرارة من أن يصبح شائعاً، منها صعوبة البدء والحساسية لعوامل توتر معينة مثل NH_3 و H_2S. ويمكن استخدام طين البنتونيت لإزالة كبت H_2S, NH_3، من ناحية أخرى، يمكن إيقاف عملية تكوّنه عن طريق حقن متلقيات الإلكترون، كالأكسجين أو النترات، في المفاعل.

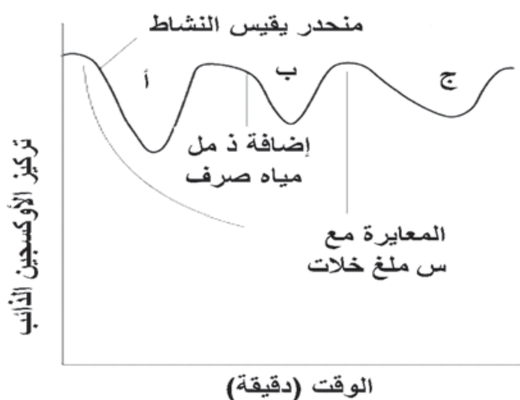
قد تكون المشكلة الكبرى، على الأقل بالنسبة إلى أجهزة هضم حمأة الصرف الصحي، هي في تقليل كتلة N و P التي يعاد تدويرهما إلى تيار المصنع الرئيسي عن طريق ما يسمّى مياه الحمأة . في الواقع، إن أكثر من 50 ٪ من حمأة N تتحلل مائياً أثناء الهضم، وتحتوي الحمولة الناتجة المعاد تدويرها عادة على غرام NH_4^+/L، التي يمكن أن تسهم بنسبة 20 ٪ من حمولة مؤثر N في الطافي المعالج.

يسبّب هذا الحمل الإضافي من المغذيات مشاكل إضافية في ضوء المعايير الجديدة الأكثر صرامة بشأن محتوى المغذيات في طافي المياه المهدورة. وقد يكون هذا هو الحال أيضاً بالنسبة إلى P لأن بعض الباحثين وجدوا أنه قد يتحرر 60 ٪ من P المرتبط بالحمأة أثناء الهضم اللاهوائي . وقد تم تطوير علاجات مختلفة في الماضي كي ترسب P كيميائياً. إلا أن تكلفة هذه العلاجات، منعت استخدامها في الممارسة العملية. ويبدو أن الترسيب بالجير المحكوم بالرقم الهيدروجيني جذاب، لأن ارتفاع درجة الحموضة قد يساعد أيضاً على إزالة الأمونيوم بواسطة التجريد (Stripping) ويمكن تقليص التكاليف المرتبطة بإضافة الجير إلى حد كبير بواسطة تهوية النفايات السائلة مسبقاً من أجل إزالة إمكانية التدرئ (Buffering)

المرتبطة بالقلوية . ويمكن أيضاً أن تقترن هذه الطريقة بإضافة أملاح الحديد أو الألومنيوم، ويفضل من مصدر رخيص مثل الحمأة الغنية بالألومنيوم/الحديد من محطات إنتاج مياه الشرب. ولا يزال هنالك أسلوب آخر هو تحسين ظروف ترسيب الستروفات ($MgNH_4PO_4$) من خلال التبريد وتجريد CO_2.

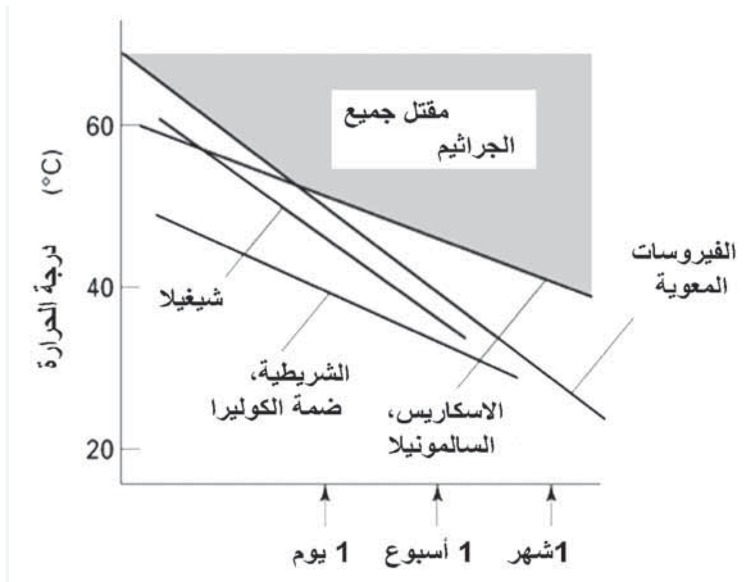
يمكن للتقانات الحالية مثل التحييد الهوائي أو اللاهوائي (Aerobic anaerobic stabilization)، والتخلص من الملوثات بحرق الملاط العضوي أن تصبح أقل تكلفة شريطة توفير طرق أكثر كفاءة، وأقل تكلفة لإزالة الماء من الحمأة من 2-5 ٪ لتصل إلى 25-40 ٪.

يكمن التحدي الرئيسي للتقانة الحيوية البيئية في تطوير الأنزيمات، والمنتجات والمعالجات التي تسمح بنزح مياه مرضى أكثر من حمأة الكتلة الحيوية الجرثومية الفائضة. ويجري تطبيق تطويرات جديدة تجارياً تعتمد على إنتاج الحرارة خلال مرحلة ما بعد المعالجة الهوائية، وذلك لتبخير المياه الزائدة. إن عملية التجفيف البيولوجية هذه تتطلب طاقة أقل من تقنيات التجفيف الحرارية. وهنالك مشكلة واحدة حساسة للغاية، تعترض هذه الطريقة، هي في توليد الروائح الكريهة، التي تسببت في توقف العمل في محطات عدة.



الشكل 7.17: رسم لسيماء تنفس باستخدام جهاز استشعار بيولوجي لقياس BOD، وإمكانية سمّيّة مياه الصرف قبل أن تدخل محطة المعالجة. إضافة الأسيتات إلى الوعاء الهوائي الذي يحتوي الحمأة المنشطة يؤدي إلى انخفاض مؤقت في تركيز O_2 (الحوض أ). المنحدر الأولي

لهبوط O_2 يؤشر إلى نشاط الكائنات المجهرية التي تستخدم الخلات، في حين تعكس مساحة الحوض أ كمية BOD المضافة . ويمكن استخدام هذا الأخير لقياس BOD_5 و BOD الإجمالي في عينة مياه الصرف وذلك بمقارنة المساحات السطحية للحوضين أ و ب. ثم يتم استخدام مقياس BOD لضبط معدل جريان المصنع. أما حصيلة الحوض ج، فيحصل عليها من دفعة ثانية من الخلات، الذي يشير إلى أن نشاط الكائنات المجهرية التي تستخدم الخلات قد انخفض (المنحدر الأصغر) وذلك بسبب وجود مركب سام في عينة مياه الصرف المضافة في ب. إن الإجراءات العلاجية الممكنة هي : (1) استخدام مضافات لإبطال مفعول السمّيّة في التدفق الرئيسي للمصنع، على سبيل المثال مسحوق الكربون المنشط، و(2) استخدام الدارئ (Buffer) وتخفيف المياه المستعملة السامة مع سائل غير سام، أو (3) إضافة الحمأة المخزونة بغية تعزيز النشاط الميكروبي. استخدام الأمونيوم، أو مواد أخرى، بدلاً من الخلات قد يتبعه نشاط أنواع أخرى من الكائنات الحية الدقيقة.



الشكل 8.17: أزمان المكوث على قيد الحياة (Survival times) للكائنات المجهرية الممرضة عند التعرض المستمر لدرجات حرارة مختلفة. المفاعلات متوسطة درجة الحرارة (Mesophilic) المُعالجة للروث الحيواني أو حمأة المجارير التي تعمل على 20-30 $^{\circ}C$ مع أوقات استبقاء (Retention time) من شهر واحد، لا تقضي على السالمونيلا تماماً. والمفاعلات مرتفعة الحرارة (Thermophilic)، التي تعمل بدرجة 55 $^{\circ}C$، تنجح في قتل جميع الكائنات الممرضة بعد زمن استبقاء من بضعة أيام.

معايير تصميم لأنواع مختلفة من المفاعلات اللاهوائية. معدل التحميل، وهو مقياس لمدى كفاءة العملية، يكون مرتفعاً مع مفاعلات UASB بسبب احتباس الكتلة الحيوية في حبيبات الحمأة، ومرتفع في مفاعلات الحالة الصلبة، نظراً إلى تركيز الكتلة الحيوية العالي. ولا تشترك المفاعلات المختلطة بأي من هذه المزايا، وبالتالي فهي أقل كفاءة (لأنها ذات معدل تحميل صغير وأزمان استبقاء هيدروليكية طويلة)

	مفاعل UASB(أ)	**مفاعل مختلط**	**مفاعل الحالة الصلبة**
السائل المُعالَج	**مياه الصرف**	**الطين العضوي**	**النفايات الصلبة**
تركيز الصلب في المفاعل، غم/ لتر	<50	50-100	200-400
معدل التحميل، كغم عضويات متر مكعب/اليوم	10-30	2–5	20-40
زمن الاستبقاء الهيدروليكي، (أيام)	0.3-1	20-40	10-20
زمن الاستبقاء الصلب، (أيام)	>20	20-40	10-20

(أ) UASB، غطاء الحمأة اللاهوائية ذات الدفق الصاعد (upflow anaerobic sludge blanket).

4.17 معالجة الفضلات الصلبة Treatment of solid wastes

يتم التخلص من النفايات الصلبة بشكل رئيسي عن طريق طمرها في أراضي معيّنة، وتسمى هذه الطريقة بالطمر (Land filling)، وكذلك يتم التخلص منها عن طريق محارق أو "بالحرق" (Incineration).

لم تعد طريقة الطمر حلاً مناسباً لهذه المشكلة، لأنها لا توفر فرصة تكرير وإعادة استعمال (Recycling) لمواد يمكن استعمالها مرة أخرى مثل النواتج البلاستيكية، والورقية، ومواد البناء... إلخ. كما أنها طريقة غير كفوءة في استرجاع الطاقة الموجودة في الغازات الحيوية مثلاً. والأكثر من ذلك فإن ما يرشح من سوائل وما يتصاعد من غازات من المطامر يلوث البيئة. أما بالنسبة إلى

طرق الحرق فهي مكلفة جداً، وهذه الصبغة تجعلها غير مرغوب باستعمالها، فهي تكلف ما بين 100 إلى 250 يورو لكل طن من النفايات المختلطة.

ومما يزيد على ذلك أنها تتطلب أجهزة وأعمدة خاصة لتنقية الغازات أو الهواء من الغازات العادمة الملوثة (Flue gases) المؤذية للبيئة.

إن الحل الأنسب لهذه المشكلة الذي يلقي رواجاً، وهو الآن في مراحل التسويق، هو طريقة العزل والتحلل بالخلط (Separation and Composting) في محطات ضخمة تعمل بكفاءة عالية تتراوح بين (100,000 إلى 300,000 طناً في السنة) من النفايات وهي تتضمن سلسلة من وحدات عزل فيزيائية لاسترجاع المواد التالية من النفايات:

- رمل وحصى ليباع كمواد بناء.
- حديد، ليباع في الصناعات المعدنية.
- المنيوم ومعادن أخرى تعتبر ذات قيمة شرائية عالية.
- ألواح كارتونية وورق تباع لصناعات الورق.
- مواد قابلة للتحلل العضوي تحول إلى سماد مُعالج (Compost) وإلى غازات حيوية.

إن المبدأ وراء بناء محطات من هذا النوع هو تقليل حجم المواد المراد طمرها أو إحراقها. وإن أول هذه المحطات تم بناؤه في ألمانيا، وهولندا وبلجيكا. انظر الصورة (9.17). وبما أن مجموع المواد التي يمكن تحليلها بيولوجياً تشكل حوالى 60% من النفايات الصلبة، لذا فقد أُعيرت هذه التقنية اهتماماً خاصاً. إن عملية إنتاج السماد المعالج من المواد العضوية المتحللة حيوياً عملية شائعة في مناطق يتم فيها جمع القمامة الحيوية من خضروات وفواكه ومخلفات الجنائن، أو المخلفات الحيوية بشكل انتقائي وغزير. ويتم تجهيز هذا السماد المعالج من المخلفات البلدية الصلبة إمّا هوائياً أو بطريقة لاهوائية. فالتحلل الهوائي هو طريقة تقليدية معروفة، أما الطريقة اللاهوائية فقد طورت حديثاً ولها حسنات كثيرة (انظر الجدول (3.17)).

هناك شركات عديدة تقدم تصاميم مختلفة لطرق الهضم الهوائي واللاهوائي للنفايات الصلبة، وهي مختلفة عن بعضها البعض في ما يلي:

- تركيز المواد الصلبة في المفاعل من 50 إلى 400 غرام لكل لتر.
- درجة الحرارة (من معتدلة Mesophilic حوالى 35 درجة مئوية أو حرارية Thermophilic درجة 55 درجة مئوية).
- عدد المراحل المستعملة (واحدة أو اثنان).



الشكل 9.17 : مفاعل مغلق يستعمل للتحويل الحيوي اللاهوائي للنفايات إلى غازات حيوية (مزيج من الميثان وثاني أوكسيد الكربون). يستفاد من الغازات الحيوية في توليد طاقة كهربائية يمكن بيعها إلى الشبكات الكهربائية. الصورة لمحطة نمساوية بقدرة 20000 طن من كتلة نفايات حيوية (Biowaste) مع مرحلة واحدة من المعالجة الحرارية sigle – phase – thermophilic soild state –. إن الحزام المتحرك في الصورة يقوم بنقل قطع صغيرة معززة من النفايات الحيوية إلى وحدات التجريع. بعد ذلك تجري عملية المزج مع العزلات الجرثومية المخصصة للتقليح ثم تحضن في درجة حرارة تصل إلى $55\ ^{\circ}C$ وذلك عن طريق الحقن بالبخار. يضخ بعدئذٍ الخليط المتفاعل إلى الأعلى عن طريق أنبوب يظهر في الصورة على الجهة اليسرى، أما الأنبوب الموجود على اليمين فيقوم بنقل الغازات الحيوية من أعلى المفاعل إلى موقع آخر. كل طن من الفضلات الرطبة ينتج 135 متراً مكعباً من الغازات الحيوية 250 kwh بعد فترة استبقاء أمدها 16 يوماً أي ($9\ m^3$ .biogas/m^3/day)

الجدول 3.17: مقارنة بين التحلل بالخلط لتكوين سماد مُعالج ـــــ كومبوس ـــــ (Composting) هوائياً ولاهوائياً، التحلل النهائي أرخص ثمناً، وكان يفضل بالماضي، ولكن مع المواصفات الإيجابية للتحلل اللاهوائي أصبح هذا الخيار أكثر جاذبية، لأنه يتم في مكان مغلق، ويحتاج إلى مكان أصغر وهو أقل رائحة، ويتخلص من الكائنات الجرثومية المرضية بطرق أكثر كفاءة

	تحلل بالخلط لتوليد كومبوس (هوائياً)	**تحلل لاهوائي بالخلط لتوليد كومبوس**
الكلفة	60 يورو للطن	75 يورو للطن
المساحة المستعملة	كبيرة	صغيرة
التعامل مع الطاقة	يستهلك طاقة	ينتج طاقة [أ]
الرائحة	مشكلة	ليست بمشكلة
نوعية الكومبوس عند نهاية التحلل		
محتوى الأملاح	عالية (بمستوى سمية عالية)	قليلة
التحميلة الجرثومية الممرضة	موجودة	غير موجودة

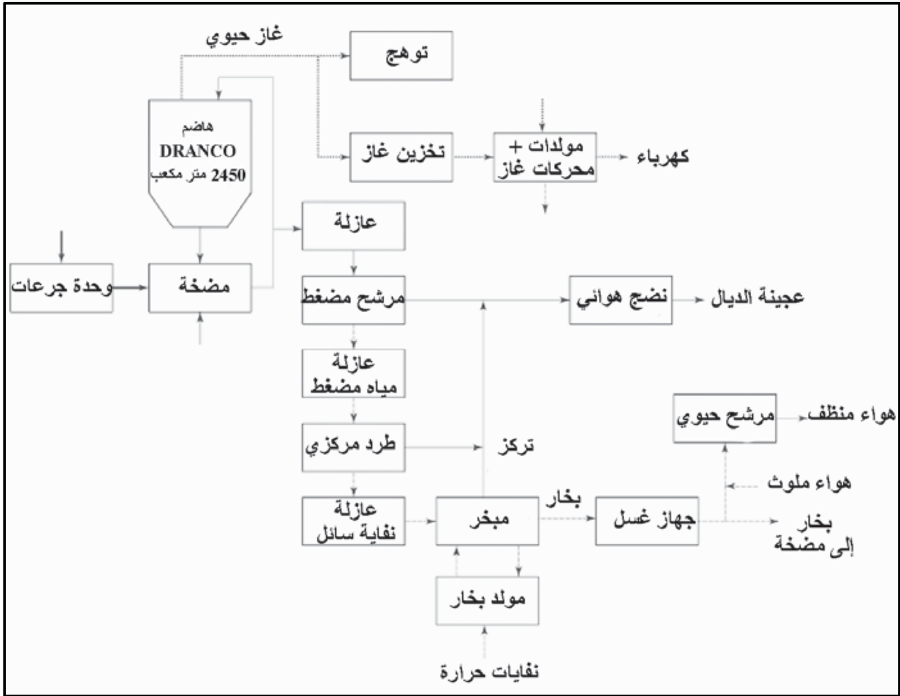
(أ) 600 كيلواط بالساعة من الطاقة تتولد من الغازات الحيوية لكل طن من الفضلات الحيوية الرطبة (المبلولة). أما باستخدام طريقة الحرق في محرقة غازية فإن 33% من التحول الكهربائي ينتج طاقة كهربائية بمقدار 200 كيلوواط بالساعة.

وأحد هذه التصاميم هو ما يسمى بالأسمدة الجافة اللاهوائية DRANCO أو (Dry Anaerobic Composting) يستعمل حرارة تقدر بـــ 55 درجة مئوية

وتركيز مواد صلبة، عالٍ (200–400 g/l) غرام لكل لتر في مرحلة واحدة من التخمير.

وهذه الطريقة مشابهة في الحقيقة لطريقة الطمر، ما عدا أنها تُنفذ في مفاعل مغلق وتحت ظروف مسيطر عليها، حيث تجري فيها التفاعلات بمقادير أعلى بكثير. إن مقدار وسرعة التفاعلات هذه تجعل عمليات التحلل والتخمر تكتمل في فترة أسبوعين فقط (انظر الجدول 2.17) بدلاً من عشرين عاماً التي تستغرقها طريقة الطمر.إن مفتاح نجاح هذه العملية هي درجة الحرارة وعملية الخلط والتقليب خلال عملية التدوير التي تسرع التفاعل، وبإضافة التربة مباشرة إلى المفاعل بدون الحاجة إلى ماء تخفيف (انظر المخطط 10.17). ولكن إذا نظرنا إلى العمليات الرطبة (Wet process) التي يدخل فيها الماء لتخفيف المادة المضافة ولتزويد الملاط بشكل وحول طرية إلى داخل المفاعل، فإن هذه الطريقة تواجه مشكلة استهلاك ماء كثير، خاصة عندما يكون المفاعل بحجم كبير. وبالنظر إلى صعوبة توفير التحريك الكيميائي للمواد الصلبة، فالسوائل الخارجة من المفاعل يعاد تكريرها لعدة مرات، مع استمرار إضافة مواد إطعام جديدة في كل مرة، ولكل معامل (الشكل 10.17).

لقد أثبتت النواتج الدبالية الرطبة النهائية (Humus end – product) بأنها ممتازة لإنعاش التربة أكثر بكثير من الكومبوس الناتج من التحلل الهوائي، بما يخص قدرة النباتات على الإنبات (Plant germination) وكذلك مقدار المحصول. والسبب في ذلك يعود لإمكانية إنتاج التحلل الهوائي في الكومبوس الهوائي مواد سمّيّة لارتفاع تركيز أملاحه العالي، بينما يحتوي الكومبوس الناتج من التحلل اللاهوائي كميات من الأملاح أقل بكثير، وذلك لأن معظمها يتم التخلص منها عندما تعصر وتضغط لإخراج الماء منها (الشكل 10.17). كذلك نواتج الكومبوس اللاهوائي لا تحتوي على بذور ملوثة لحشائش برية، ولا كائنات مجهرية مرضية مقارنة بالناتج من التفاعل الهوائي.



الشكل 10.17: مخطط سير عملية لمصنع تسميد لاهوائي يعالج 000 20 طن نفايات بيولوجية سنوياً في كايزرسلاوترن، النمسا . يتم تغذية النفايات مباشرة في هاضم مرحلة واحدة حالة صلب لاهوائي (300 غرام مواد الصلبة/ لتر)، محافظ عليه على 55˚C، حيث كل طن من النفايات الرطبة ينتج 150 ~ مترمكعب غاز حيوي (60 ٪ ميثان). يتم تحويل الغاز الحيوي إلى بخار لإحماء الهاضم وإلى كهرباء في محرك يعمل على الغاز . يعاد استخدام النفايات الحرارية من المحركات لتبخير المياه العادمة الناتجة أثناء الإزالة الميكانيكية لماء العجينة المهضومة. . يخضع المعجون منزوع الماء (500 غرام مواد الصلبة/ لتر) إلى معاملة لاحقة قصيرة (2-1 أسابيع) هوائية تنتج مادة شبيهة بالدبال . المراحل المختلفة حيث يتم إنتاج الروائح الكريهة، على سبيل المثال التسميد الهوائي، يتم تهويتها، ويتم التعامل مع نفايات الهواء فى مرشح بيولوجي، حيث تتم إزالة المركبات العضوية المتطايرة.

إن القيمة السلعية (Market value) للكومبوس إجمالاً قليلة نسبياً، وبحاجة إلى معاملات أخرى تسمى عمليات ما بعد المعالجة من أجل تأهيله لحاجات معينة. ويتم ذلك عادة عن طريق إضافة أحياء مجهرية معيّنة تقوم بتثبيت النيتروجين أو بكتريا معينة تشجع نمو النباتات كالــ *Mycorrhizae* أو أحياء مجهرية للتحكم الحيوي (microcontrol أو Biocontrol) . كذلك يمكن لمشروع إعادة تحسين الترب الملوثة أن يستفيد من هذا الكومبوس، حيث يكون إما مصدراً لكائنات حية

مفيدة لعمليات تحليل المواد الدخيلة المسماة Xenobiotic، أو كمادة عضوية تساعد على التصاق المواد الغريبة هذه والتخلص منها.

5.17 معالجة الفضلات الغازية Treatment of waste gases

تنبعث الغازات غير المرغوب فيها من مواد عضوية مختلفة لا يزيد تركيزها على ميكروغرام واحد لكل متر مكعب أو أقل. ومعظمها يعود إلى مصادر صناعية أو منزلية. سيصبح تلوث الهواء عموماً، وبالأخص انبعاث الروائح المزعجة في المقبل من السنين من المهمات الكبيرة التي يتوجب السيطرة عليها. فالمصافي والمرشحات الحيوية التي تقوم على تنقية الهواء من الغازات والروائح في أجواء المنزل الآن تتطور بشكل كبير. والنقطة الأساسية في هذه التقنية القدرة على تنمية إنماء كائنات مجهرية قادرة على إزالة أنواع عدة من الغازات الطيارة حتى ما كان منها بتركيز قليل أو موجود في حالة غازية.

1.5.17 إزالة المركبات العضوية الطيارة

Removal of volatilic organic compounds (VOC)

إن طرق المعاملة التقليدية الكيمياوية/الفيزياوية للغازات الملوثة كطرق الاحتراق (Combustion) أو الادمصاص (Adsorption) على مرشحات الفحم المنشط المفعّل (Activated coal filters) تستهلك طاقة عالية وتنتج مواد ملوثة ثانوية (Secondary pollution). تصل تراكيز التلوث في الانبعاثات الصناعية على سبيل المثال إلى $100\ ml/m^3$. ولحرق هذه الغازات في محرقة يتطلب إضافة 50 ليتراً من الميثان في الأقل إلى كل متر مكعب للتأكد من أن الاحتراق سيكون كاملاً. وتتمكن المفاعلات الحيوية في معظم الأحيان من تحقيق نفس مستوى الأكسدة، شريطة أن يكون VOCs بتماس مع الجراثيم المحللة والـــ O_2 والـــ H_2O وكذلك المواد المغذية. هذا وإن سرعة التحلل هنا تعتمد على نوع المادة المطلوب تحللها كالآتي:

- مواد التفتيت الحيوي السريع Quickly biodegraded: كالكحول، والكيتون (Ketones) والألدهايد (Aldehydes) الأحماض العضوية (Organic acids). والمواد العضوية النيتروجينية (Organo – N).
- مواد التفتيت الحيوي البطيء Slowly biodergarded: كالفينول Phenols، والهيدروكربونات (Hydrocarbons)، والمذيبات (Solvents) كالكلوروإثين (Chloroethene).
- مواد التفتيت الحيوي البطيء جداً Very slowly biodegrated: كالهالوجينات المتعددة (Polyhalogenated)، والهيدروكربونات العطرية المتعددة (Polyaromatic – hydrocarbons).

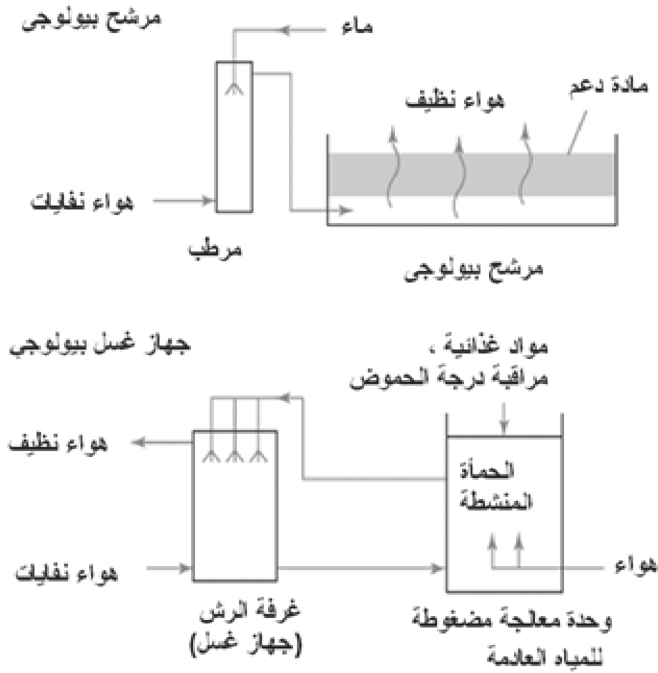
وعلى الرغم من أن كثيراً من الملوثات الغازية يمكن أن نتخلص منها عن طريق استعمال المرشحات الحيوية هذه، ولكن استعمالها وتطويرها كان بطيئاً، ربما لأن رخص أسعارها لم يجعلها جذابة من الناحية التجارية، لذلك لم تتطور. وربما لأن الطرق الفيزياوية/الكيمياوية المستعملة حالياً تفي بالغرض.

لقد صممت أنواع متعددة من المفاعلات لمعالجة الهواء بطرق بيولوجية (الشكل 11.17) ففي المرشحات الحيوية (Biofilters) ينساب الهواء الملوث ببطء من خلال وسط مبلل مسامّي (Wet porous medium) – مثل الكومبوس، وبقايا الخشب الخث (Peat)، أو الأنسجة النباتية شبه المتفحمة التي تساعد الكائنات المجهرية المحللة الموجودة في طبقات خفيفة من الماء تغلف أجزاء هذا الوسط على تحللها. ويجري الغاز السطحي الناتج بمعدل يتراوح بين 1 إلى 15 cm/s. وهذا يعني أن الوقت المطلوب للتماس في حوض ارتفاعه 1–3 m هو 10–100s– أما بالنسبة إلى المركبات التي تتحلل حيوياً بشكل اعتيادي، فإن كفاءة التخلص من 90% من هذه الملوثات يمكن توقعه وبحجم تحميل 0.1–0.25 kg من المواد العضوية لكل متر مكعب في المفاعل في يوم واحد (0.1–0.25 kg organics m^{-3} reactor day^{-1}). ومن محاسن المرشحات الحيوية:

- بساطة ورخص التصميم (ويدعم مواد لا بد من تبديلها كل 2–4 سنوات).

- أن مساحة السطح الداخلي العالية تجعل المرشحات الحيوية مناسبة وبشكل مثالي للتخلص من الملوثات التي تذوب بشكل ضعيف كالهيدروكربونات.

احتمال حقن المفاعل ببكتريا متكيفة بشكل خاص على تفتيت المواد الدخيلة عليها (Xenobiolic)، مثال على ذلك الكلوروميثان.



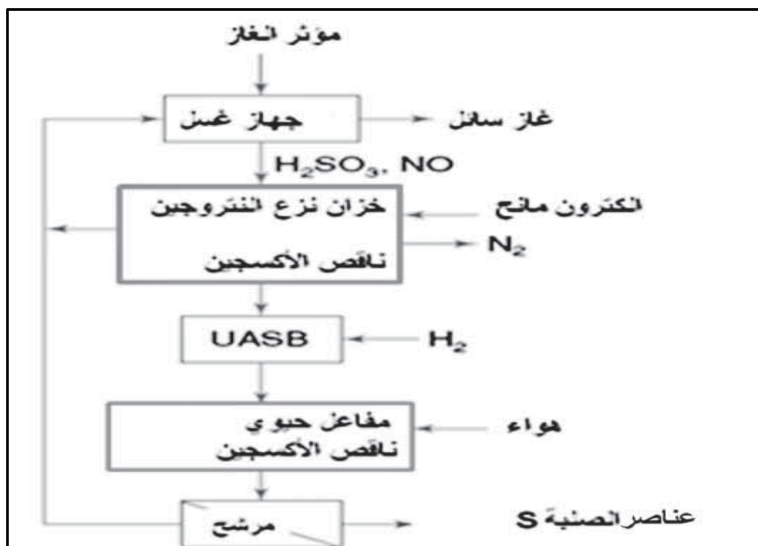
الشكل 11.17: المصافي الحيوية للتخلص من المواد العضوية الطيارة (VOCs) من الغازات الملوثة بالطرق الحيوية. تكون المرشحات الحيوية (Biofilters) بسيطة التركيب ورخيصة الثمن، ويمكن استعمالها باستمرار، ولكنها تحتاج إلى مساحة سطحية واسعة. أمّا الداعكات الحيوية (Bioscrubbers) فإنها تعتمد على الطرق التي تعالج بها مياه الصرف، أي بطريقة الملاط المفعل أو المنشط أو المرشحات الوشيلة (Trickling filter) وتتم بعد أن تنقل المواد الملوثة من طور غاز مبلول Aqueous phase تُؤْخَذ إلى أحواض الدعك (Scrubber). إن الدعاكات الحيوية أسهل إدامة وتحتاج إلى مساحة سطحية قليلة ولو أنها أكثر ثمناً وقدرتها إلى إزالة الهيدروكربونات ضعيفة. المواد المساندة، هواء نقي، مرشحات حيوية، مواد نايتروجينية وضبط الحموضة، وحدة مياه ملوثة معالجة، حوض الرش (الدعاكات) هواء ملوث، الدعك الحيوي.

إن المشكلة الصعبة التي تصاحب هذه الطريقة هي في السيطرة على درجة الحموضة (pH) في المرشح الحيوي، لأن الـــ H_2S يتأكسد إلى H_2SO_4 والـــ NH_3 إلى HNO_3، والمواد العضوية الكلورية (Chloroorganic) تتحول إلى HCL. لذلك تنخفض كفاءة إزالة الكبريتات ثنائية المثيل (Dimethyl sulphide) والتخلص منها بواسطة المرشح الحيوي المعزز ببكتريا الـــ *Hyphomicrobium* خلال فترة شهرين فقط من بدء استخدامه حيث تنخفض الكفاءة من 1 إلى 0.1 غرام بالمتر المكعب لليوم الواحد، وذلك لأن درجة الحموضة تنخفض إلى 4.0. إن إضافة حجر الكلس (Limestone) وهو مسحوق كربونات الكالسيوم ($CaCO_3$) بمقدار 25 كيلوغرام لكل متر مكعب من الكومبوس، يساعد على التخلص من هذا الانخفاض خلال مدة الشهرين. ولا بد أن نذكر بأن أهم مشاكل المرشحات الحيوية هي حاجتها إلى مساحة سطحية كبيرة، ومن الصعب السيطرة على ظروف التفاعل فيها، وخاصة درجة الحموضة، كما أن المواد العضوية المستعملة فيها، وهي الكومبوس مثلاً، هي مواد تسبّب انبعاث روائح غير مرغوب فيها.

إن الطريقة أو التقنية المطوّرة لتفادي السلبيات في المرشحات الحيوية هي تقنية الدعك الحيوي (Bioscrubbing). انظر الشكل (11.17). وفي هذه التنقية يتم استعمال غُرف تمرّ بها الغازات الملوثة حيث يسلط عليها تيار من سائل بشكل رذاذ، فيه كائنات مجهرية، لها قدرة على تفتيت النفايات الغازية. هذا وتبقى الغازات لزمن كافٍ، وذلك بتكرار دورانها بالغرفة لعدة مرات. إن أهم المقاييس التي لا بد من مراعاتها لأجل الحصول على تفاعل كامل هو وجود ما يكفي من المواد المغذية لهذه البكتريا، وكذلك درجة الحرارة المناسبة التي يتم تضبيطها برذاذ بخاري ينطلق من مرشّات لرش الغازات المراد معالجتها نفسها. وهذه الطريقة أسهل بكثير من مثيلاتها في المرشحات الحيوية التي طالما يحصل فيها انسدادات. من ناحية أخرى لا تحتاج الداعكات الحيوية إلى مساحة كبيرة كالمرشحات الحيوية التي تحتاج إلى مساحة كبيرة وارتفاع كبير. فالداعكات بحاجة إلى غرفة ارتفاعها بضعة أمتار فقط. وتضيف هذه الصفة إيجابية كبيرة لهذه التقنية.

من ناحية أخرى تناسب الداعكات الحيوية مقادير الانسياب العالية من الهواء، وذلك لأنها صغيرة الحجم نسبياً، فضلاً عن أنها تحتاج إلى ضغط واطئ، وهي مخصصة لإزالة الغازات التي يمكن أن تذوب بشكل جيد، حيث إن الكتلة

المتحركة في غرفة الرش أقل بكثير من تلك الموجودة في وحدة المرشح الحيوي. وفي حال وجود تركيز عالٍ للتلوث في الغازات فإن داعكة حيوية ثانية تلقح بالكائنات المجهرية القادرة على تحليل الملوثات لا بد من إضافتها إلى المحطة. هذا ولا تزال هذه الفكرة بحاجة إلى تطوير.



الشكل 12.17: التطورات الحديثة في تقنية إزالة المواد الكبريتية (Desulphurisation) والتخلص من الــ NO في ذات الوقت من الغازات المتولدة من محطات المعالجة الحرارية (Thermic Plants) وذلك باستخدام طرق حيوية. إن الخطوات المتتابعة المبينة بالشكل تتمثل أولاً بالإذابة في غرفة الدعك (Solubilisation in a scrubber) من أجل إزالة الــ N من المفاعل الحيوي. أمّا الكبرتيت (Sulphite) فيختزل إلى كبريتات (Sulphide) في مفاعل (UASB).

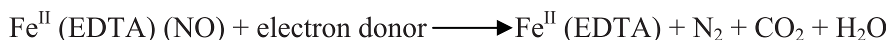
لقد أجري في الوقت الحاضر الكثير من البحوث التي تهتم بتصميم منظومة لها القدرة على دمج عملية ادمصاص الغازات على سطوح صلبة (مثل الكربون المنشط)، وبالتحلل الحيوي للمركبات المدمصة أو الممتزة (Sorbed compound)، وتوفر المرشحات الحيوية الوشيلة (Biotrickle filters) وهي عبارة عن أغطية بلاستيكية أو ما شابه ذلك من السطوح التي تعلّق في مجري الغاز الملوث. وتنشطف باستمرار بواسطة دش من الماء المكرر الذي يحتوي على مواد غذائية وأحياء مجهرية. هذا ويُعلّق على هذه المرشحات مزيد من الأمل حينما

تكون المساحة المتاحة صغيرة، ولأن معدلات الأكسدة الحيوية في وحدة حجم فيها عالية. لذا، فإن أحجامها يمكن أن تكون صغيرة كوحدة فيزيائية/ كيمياوية. وبما أنها تعمل على قيم تحميل عالية. فهي حساسة لزخم التحميل العالي بما يحتم توفير متطلبات التغذية ومتابعتها باستمرار.

2.5.17 تخليص الغازات العادمة من المركبات الكبريتية والنيتروجينية حيوياً

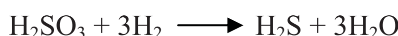
Biological removal of sulphur and nitrogen compunds from flue gases

تُعد أكاسيد النايتروجين (NO_x) وثاني أوكسيد الكبريت (SO_2) من أهم ملوثات الهواء التي تتكون من احتراق الفحم والزيوت، وتتواجد في الغازات العادمة (Flue gases). وهنالك اهتمام كبير لتطوير طريقة بيوتكنولوجية رخيصة وكفوءة للتخلص منهما معاً، وبنفس الوقت. إن الطرق الفيزيائية/الكيميائية التلقليدية إما مكلفة أو لا تعمل بالكفاءة المطلوبة. ولقد اقترحت منظومة جديدة يتعرض فيها الغاز الملوث إلى رشاش مائي للتخلص من 95% من الــ SO_2 وأكثر من 20% من الــ NO_x وذلك بذوبانه في الــ $Na\ HCO_3$ (Fe (II) – EDTA) (المركب الأخير يزيد من ذوبان الــ NO_x الذي يمثل عنق الزجاجة في هذه العملية). ويعاد توليد المحاليل المحملة بالــ S والــ N بعدئذٍ بثلاث خطوات بيولوجية متتابعة (الشكل 12.17). تستخدم الخطوة الأولى المفاعل اللااكسجيني (Anoxic reactor) الذي يتحول فيه الــ NO إلى غاز N_2 خلال عملية نزع النيتروجين Denitrification.

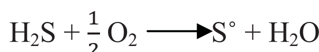


$$Fe^{II}\ (EDTA)\ (NO) + \text{electron donor} \longrightarrow Fe^{II}\ (EDTA) + N_2 + CO_2 + H_2O$$

ويتطلب إضافة متبرع بالالكترون مثل الميثانول أو الإيثانول، للمحافظة على استمرارية التفاعل، وهما الخطوتان التاليتان التي فيهما يتم اختزال $H_2\ SO_3$ تتابعياً وبطريقة بيولوجية إلى H_2S، وأخيراً يعاد أكسدته جزئياً ليتحول إلى كبريت صلب:



$$H_2SO_3 + 3H_2 \longrightarrow H_2S + 3H_2O$$



$$H_2S + \frac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow S^\circ + H_2O$$

تجرى عملية اختزال الــ H_2SO_4 في مفاعل الــ UASB (الشكل 5.17)، المزود ببكتريا لها القدرة على اختزال الكبريت (Sulphate –

(reducing bacteria. وتضاف بعدئذٍ إليها حبيبات البوليمر مع مواد مغذية ومقدار معادل من الإيثانول أو الــ H_2 لتعديل النسب المولارية لــ (BOD/H_2SO_3). وقيمتها واحد في المفاعل الثالث تُؤَكسِد البكتريا الهوائية H_2S وتحوله إلى الكبريت الصلب S° (منتج نهائي). وبالسيطرة على كمية O_2 يسيطر على معدل الأكسدة، وبالتالي توقف عملية تحول S° إلى H_2SO_3 و H_2SO_4. تحديد كمية الأكسجين الداخل للتفاعل. تجرى العمليات هذه جميعاً بصورة مؤتمتة باستخدام ما يقارب الــ 120 مؤشراً. لا بد من مراقبته كل الوقت ومعظمها تتم عن طريق الكومبيوتر (On–line)، مع تكرير الماء باستمرار.

مما لا شك فيه أن عملية نزع الكبريت حيوياً (Biodesulphurisation) يمكن تطبيقها مستقبلاً في معالجة الفضلات السائلة الأخرى، وهناك اهتمام متزايد لإزالة المواد الملوثة من الفضلات السائلة باستعمال البكتريا المحللة للمركبات الكبريتية، في مفاعلات UASB الكبريتية المسمّاة (Sulphidogenic UASB). هذا وتصل تراكيز الكبريت إلى مستويات عالية في طافي مياه الصرف في معامل الورق وصناعة الألواح الكرتونية (إلى حوالى 2 g/l)، وفي مخمرات مصانع السوائل السكرية (Molasses – based fermentation Industry) حيث تصل إلى 9–2 g/l وكذلك في مصافي زيوت الطبخ حيث تصل إلى 50 g/l. وهنالك كميات كبيرة من الكبريت تتواجد في مجاري الصرف الحمضية من معامل التعدين عندما يكون التعامل مع صخور البارايت (Pyrite rock) حيث تتواجد معادن ثقيلة يتم معالجتها بهذه الطريقة بكفاءة، ويتم إزالة أكثر من 99% منها عن طريق ترسيب الكبريت.

6.17 إصلاح التربة Soil remediation

إحدى أكبر المشاكل التي تواجه عالم الصناعة اليوم هو تلوث التربة والمياه الجوفية، وكذلك الترسبات (Sediments). وإن المبالغ المصروفة عالمياً على التخلص من المواد الخطرة الملوثة للتربة وإصلاحها يصل إلى حوالى 16 مليار دولار أمريكي لكل عام. وهناك ما لا يقل عن 350000 موقع ملوّث في أوروبا الغربية وحدها تكلّف ما لا يقل عن 100 مليار يورو لتنظيف أكثرها خطراً على مدى الــ 20 إلى 25 سنة القادمة. ومن أكثر الملوثات ضرراً المذيبات المكلورة

(Chlorinated solvents)، والهيدروكربونات، والمواد متعددة الكلور وثنائية الفنيول (Polychlorobipenyls)، والمعادن. إن المعالجة الحيوية (Bioremediatin) التي نعني بها استخدام الأحياء المجهرية لتفتيت أو إزالة السمية (Detoxification) أصبحت في رواج متزايد، وهي الآن مستعملة بشكل دائم لحالات التلوث بالهيدروكربونات. مع أن، المعالجة الحيوية هذه لا زالت تعاني أزمة ثقة، ولا زال نجاحها موضع نقاش. والسبب الأساسي في ذلك يعود إلى صعوبة توقع مدى نجاحها مستقبلاً، وذلك، لنقص المعلومات التي تساعدنا على السيطرة التامة على العمليات الحيوية فيها، ويتحدد نقص المعلومات في المجالات التالية:

- المتاحية الحيوية (Bioavailability)، مثلاً لا نعرف كيف يمكن أن يحصل التماس المباشر بين هذه الكائنات وجزيئات الملوث (انظر التوضيح في الإطار 2.17).
- التحفيز الحيوي (Biostimulation) لا نعرف ما نوفره من عوامل يمكنها أن تحفز وتنشط هذه الكائنات لأداء عملها. وأخيراً،
- التعضيد الحيوي (Bioaugmentation) كيف يمكن لكائن مجهري غريب يتم إدخاله في حقل معين أن يبدأ بالعمل ويستمر فيه ويتعايش مع الكائنات الموجودة قبله.

1.6.17 التحفيز والتعضيد الحيوي

Biostimulation and bioaugmentation

تتواجد الكائنات الحية القادرة على التفتيت الحيوي للمواد الملوثة في التربة الملوثة أصلاً وفي المياه الجوفية. لذا تحصل هذه العملية الحيوية عند توفر المواد الغذائية المناسبة التي تحفز وتنشط هذه الكائنات على العمل. وتسمى هذه العوامل بالعوامل الحيوية المنشطة (Biostimulants). لذلك فإن تسرب النفط إلى البحر أو ارتشاح (Leackage) الهيدروكربونات في المياه الجوفية يتم علاجهما بتسميد البحر، أو الأرض بالمواد النيتروجينية المغذية ومواد مغذية أخرى (انظر الجدول 4.17). وقد تضاف إليهما مواد خافضة للتوتر السطحي (Surfactants) لكي

تساعد على تحول واسع للهيدروكربونات قليلة الذوبان إلى الطور السائل حيث تستطيع الكائنات الحية الوصول إليها.

مثال آخر على المحفزات أو المنشطات الحيوية يتم عن طريق حقن الميثان في مكمن مائي (Aquifer) ملوث بمحاليل مكلورة (Chlorinated solvents)، أو حمض البنزويك (Benzoic acid) كما هو الحال في المكامن الملوثة بمادة الـــ PCBs أو (Polychlorobiophenyls). تشجع المصادر الكربونية المحقونة، كالميثان وحمض البنزويك نمو كائنات حية معينة تحتوي على أنزيمات هاضمة لكل من المواد المحقونة والملوثات الموجودة سلفاً. وحيث إن الكائنات الحية لا تستفيد من نواتج تحلل المواد الملوثة، لذا يسمى هذا النوع من التفاعل "الأيض المساعد" (Co–metabolism).

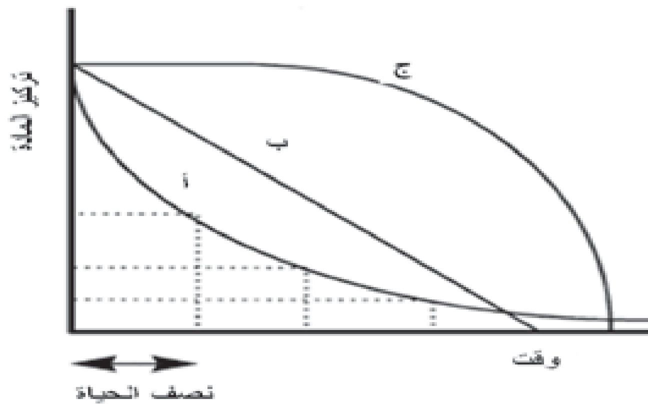
الإطار 2.17

التواجد الحيوي (المتاحية) للملوثات (Bioavailability of Pollutants)

في ظروف تحت طبقات الأرض (*under Insitu soil*) تصبح إزالة المواد الملوثة بطيئة نتيجة تواجد ضعيف للكائنات المجهرية المسؤولة عن تفتيت المواد الملوثة في التربة. إن المواد المركبة التي تمدص (Sorbed) على حبيبات صلبة كالطين والدبال (Humus) يصعب أخذها من قبل الكائنات الحية. وإن هذه الصفة يمكن أن تحسب بواسطة معادلة فيروندليش (Ferundlich–equation).

حيث إن Seq تمثل تركيز المواد الملوثة في طور الأمدصاص (Sorbent phase) وهي تحسب بالـــ ($mg\ g^{-1}$)، و OM تمثل النسبة المئوية للمواد العضوية في التربة، K_{oc} هو مكافئ التجزئة (Partition coefficient)، والـــ C_{eq} هو التركيز في الحالة السائلة، ويقاس بالـــ ($mg\ l^{-1}$)، و n هو ثابت له علاقة بالامدصاص. المركبات التي تملك قيمة K_{oc} أقل من 100 تكون قليلة الامدصاص (Little sorbed) لذلك تكون متوفرة (كالبنزين، $K_{oc} = 10^{1.9}$). فيما يمكن تقدير قيمة مكافئ التجزئة K_{oc} بسهولة مختبرياً عن طريق حساب معامل تجزئة (K_{ow}) الماء /اوكتانول (Octanol/water)، أي نسبة التركيز المعتمد في الماء وفي الاوكتانول. ويمكن استخدام قيمة الـــ k_{ow} للهيدروكربونات في تقدير نصف عمر هذه المركبات في التربة. إن قيمة نصف العمر دليل على مقدار اختفاء المواد الأولية التي تم تفتتيتها تبعاً لحركية المرتبة الأولى (First–order kinetics) (انظر الشكل 17–13).

إن هذه المفاهيم والطروحات لا توفر تفسيراً لصعوبة إزالة بعض الملوثات من التربة عندما تتواجد بمستوى أقل من حد معين، كما يلاحظ مع المبيدات (Pesticides)، وتسمى بحالة (التعمير) أو (Aging)، وقد لوحظ أن التعمير هوناتج انتشار ذرات المواد الملوثة من خلال فتحات مجهرية إلى طبقات وتجمعات ضمن المادة العضوية ثلاثية الأبعاد. وحيث أن هذه العملية لارجعية (Irreversible). فإن معاملة فيروندليش تصبح غير ملزمة وتصبح الجزيئات المختلفة من المادة الواحدة مختلفة في أنصاف أعمارها، بالرغم من أنها تعود إلى نفس المادة ونفس المركب. وكمثال على ذلك المبيدات التي تصرّ على البقاء في التربة وبدرجات أو مستوى



الشكل 13.17: حركيات التحلل البيولوجي للملوثات في أنظمة التربة عادة ما تكون من المرتبة الأولى، الأمر الذي يعني أن معدل اختفاء المادة يتناسب مع تركيز المادة الأولية (منحنى أ). مع حركيات المرتبة الأولى، يحدد نصف العمر الزمن اللازم لتحلل نصف المادة الأولية. وتحدث حركيات المرتبة الأولى عندما يكون تركيز المادة الأولية منخفضاً (أقل من ثابت انجذاب K_s) كما هو الحال غالباً في التربة. وترمز المرتبة صفر إلى معدل تفاعل ثابت مستقل عن تركيز المادة الأولية، ويحدث عادة أثناء عملية الأيض المساعد (منحنى ب). في حالات التراكيز العالية للملوثات، يسبب نمو الميكروبات زيادة في المعدلات مع الزمن فيتكون المنحنى ج.

الجدول 4.17: الاستراتيجيات المختلفة والممكنة لحث المعالجة البيولوجية (Bioremediation) للتربة والمياه الجوفية . بينما يعتمد التحفيز الحيوي على الكائنات المجهرية المتوطنة (Autochthonous)، أي تلك الموجودة مسبقاً في الموقع الملوث، يستفيد التعزيز الحيوي من البكتيريا المنماة في المختبر والفطريات أو المجاميع المتوطنة والمتكيفة مع بيئتها

الفعل	الآلية	مثال
التحفيز الحيوي، أي تحفيز الميكروبات الموجودة بالفعل		
إضافة المغذيات N، P	تحسين التركيبة الكيميائية لنمو متوازن	البقع النفطية في البحر (مثل تسرب إكسون فالديز في ألاسكا)
إضافة مواد أولية مشاركة (Co-substrates)	يتدهور (يتحلل) الملوث بسبب أنزيم محضر لتجهيز	حقن غاز الميثان ليحلل ثلاثي كلور الإيثيلين في

	المادة الأولية المشاركة	مكامن المياه الجوفية
إضافة متلقي الإلكترون (Electron acceptor)	أكسدة المواد العضوية في المياه الجوفية المحدودة عادة بفقر ذوبان O_2	حقن الهواء (Bioventing) في مكامن المياه الجوفية أو إضافة النترات
إضافة مواد التوتر السطحي (Surfactants)	الهيدروكربونات وسوائل المرحلة غير المائية (NAPLs) غير متوفرة للكائنات المجهرية	إضافة مواد التوتر السطحي ستفرق المركبات الكارهة للماء في طور الماء
التعزيز الحيوي، أي إلى (إعادة) إدخال المزارع الجرثومية المنماة في المختبر		
إضافة سلالة مكيفة مسبقاً	ربما بعض المواقع لا تحتوي على الكائنات المجهرية الكافية لتحلل الملوثات	تلقيح التربة ومحطات معالجة مياه الصرف مع محللات الكلور
إضافة اتحادات مكيفة مسبقاً	وجود المجموعة المناسبة من الكائنات المجهرية مكفول	الزرع يترسب مع مزارع تخصيب نزع الكلورمن ثنائي الفينيل متعدد الكلور
إضافة سلالات محسّنة وراثياً	مسارات التحلل الموجودة تصدر وسيطات إنهاء أو سامة	بناء سلالات إحداث أكسدة متزامن وكاملة لكلورو ولميثيل العطريات
إضافة جينات معبأة في ناقل	تنقل الجينات التي ترمز إلى وظائف مرغوبة إلى داخل كائنات مجهرية موجودة مسبقاً	تدهور ثنائي الفينيل متعدد الكلورأو مبيدات الحشرات

2.6.17 تقنيات معالجة التربة Soil remediation techniques

يجري استخدام مجموعة كبيرة ومتنوعة من التكنولوجيات الحيوية لمعالجة التربة الملوثة، وبدرجات متزايدة من التعقيد والتكلفة، وتشمل الأساليب الأكثر شيوعاً:

- المعالجة البيولوجية في الموقع *(In situ)*
- زراعة الأراضي (Landfarming)
- المفاعلات الحيوية غضارية الطور (Slurry-phase bioreactors) .

تعتمد المعالجة البيولوجية في الموقع *(In situ)* على التنظيف البيولوجي من دون الحفر، وعادة ما يتم تطبيقها في الحالات التي يكون فيها التلوث عميقاً تحت السطح أو تحت المباني والطرق وغيرها. ويكتسب الترميم الحيوي في الموقع (*In situ* biorestoration) اهتماماً لأنه يتجنب تكاليف الحفر، ولا ينتج أيّاً من المنتجات السامة، كما هو الحال مع المعالجة الفيزيائية -الكيميائية خارج الموضع *(ex-cito)*. تدور المياه تحت السطح باستخدام سلسلة من خنادق استرداد وإعادة الشحن أوالآبار. وقد تؤكسج المياه بواسطة تعريضها للهواء أو عبر إضافة H_2O_2. ولم يتلق التنظيف الجرثومي بواسطة تعزيز نشاط التحلل اللاهوائي في الموقع المزيد من الدراسة والبحث. والعائق الواضح في المعالجة البيولوجية في الموقع يتجلّى في صعوبة تحفيز النشاط الميكروبي في جميع أنحاء حجم التربة الملوثة، لأن حقن الماء الحامل للمواد الغذائية الضرورية والكائنات المجهرية يميل إلى التدفق من خلال فجوات كبيرة في التربة تاركاً كميات كبيرة من الملوثات محصورة ضمن طبقات منيعة أكثر. وقد يستغرق الأمر سنوات لنشر الملوثات إلى المناطق النشطة بيولوجياً حيث يتم حصول التحلل البيولوجي.

لقد برز مؤخراً نوع واحد محدد من المعالجة البيولوجية للتربة في الموضع يسمى التهوية البيولوجية (Bioventing)، باعتبارها واحدة من أكثر التقنيات فعالية من حيث التكلفة والكفاءة والمتوفرة لعلاج منطقة (vadose منطقة غير مشبعة فوق منسوب المياه الجوفية)، وفي المواقع الملوثة بالنفط. تشتمل التهوية البيولوجية على تحفيز التحلل البيولوجي الهوائي عن طريق تدوير الهواء تحت سطح التربة. ويمكن الحصول على كفاءات إزالة عالية (97 < ٪) للبارافينات الذائبة (C16>) والهيدروكربونات المتعددة العطريات (PAHs) بعد عدة سنوات

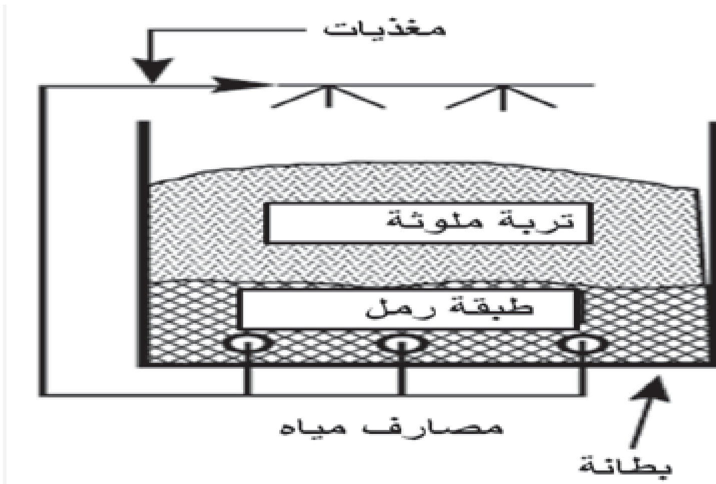
فقط من المعالجة. تقتصر عملية التهوية الحيوية على تشكيلات تحت سطحية متجانسة لأن التغاير شأنه أن يتسبب في تنقل الهواء عبر أكثر المناطق نفاذية مما يسبب اقتصار العلاج على مناطق معينة فقط.

للآخرين قصة نجاح أخرى في المعالجة البيولوجية الموقعية للتربة ألا وهي العلاج النباتي (Phytoremediation). وهنا يتم زرع نباتات معينة تراكم المعادن الثقيلة في الأنسجة النباتية فوق سطح الأرض أو تحفز التحلل العضوي في منطقة الريزوسفير (Rhizosphere) وهي المنطقة المتاخمة مباشرة للجذور. على الرغم من أن علاج النبات أنيق ونظيف ورخيص، إلّا أن المآخذ الرئيسية حول هذه الطريقة تفيد بأن الطبقة السطحية فقط من التربة يمكن معالجتها (0-50 cm)، وأن العلاج يستغرق سنوات عدة ويترك مستويات متبقية كبيرة من مجاميع الملوثات في التربة. هذا ويخضع العلاج النباتي، مع ذلك، للتطوير في الزمن الحاضر.

إن إزالة البقع النفطية بواسطة ما يسمى زراعة الأرض (Landfarming) هي طريقة معروفة أنشئت على أساس التحلل الميكروبي (الشكل 14.17). فإذا اعتمدنا نصف عمر بقدر سنة واحدة، فإن الأمر سيستغرق نحو 7 سنوات من العلاج لإزالة 6.4 كغ من المواد الهيدروكربونية لكل كلغ تربة وصولاً إلى هدف تنظيف 50 ملغ/كلغ. ويمكن رفع مستوى هذه الطريقة بعض الشيء عن طريق خلط التربة مع مخلفات عضوية طازجة (سماد كومبوس). كما أن ارتفاعات درجات الحرارة وزيادة النشاط والتنوع الميكروبي يزيد من معدلات التفاعل. علاوة على ذلك فإن المواد الأولية المساعدة (Cosubstrates) تفضل عملية التمثيل الغذائي المساعد (Cometabolism). ويمكن ترقية نظم زراعة الأرض عن طريق شمل علاج لاهوائي مسبق. على سبيل المثال، استخدام أنفاق لاهوائية للحد من مركبات مثل ثلاثي نترو توليوين بإضافة المغذيات والمواد المساعدة من أجل تعزيز البكتيريا المتوطنة. وفي مرحلة هوائية ثانية، إما أن تكون المؤيضات المختزلة متمعدنة كلياً أو مبلمرة ومثبتة بصورة لا رجعة فيها في مصفوفة التربة .

ولقد تم استخدام هذا الأسلوب بنجاح لتطهير التربة الملوثة بكلورو إيثين وبمادة عطرية اسمها BTX (خليط من البنزين والتولوين والزيلين).

يمكن للمفاعلات الحيوية غضارية الطور (Slurry-phase bioreactors) أن تحقق نفس مستويات التنظيف في زمن أقل. في هذه الحالة، يتم معالجة التربة الملوثة المستخرجة تحت ظروف محكمة ومثلى، لضمان الاتصال الفعّال بين الملوثات والكائنات الحية الدقيقة. وهذه الأخيرة هي، في معظم الحالات، زرعات محددة من الكائنات المجهرية المتكيفة. وهكذا مع معدلات تحلل شامل في نطاق 0.2-2.0 غم من النفط لكل كلغم تربة يومياً عندما يكون زمن مكوث المواد الصلبة 30 يوماً، بدلاً من عدة سنوات، تصبح الطريقة كافية لتلبية مستويات التنظيف. وتزيد تبعاً لذلك تكاليف العلاج لتصل إلى 200€/طن من التربة.



الشكل 14.17: صور مقطعية عرضية لمفاعل تربة صلب الطور، أو نظام زراعة الأرض . تخلط التربة مع المواد الغذائية والكائنات الدقيقة، وتنتشر بشكل متساو على بطانة (Liner)، مع حراثة منتظمة لتوفير الخلط والتهوية، يتبع تمعدن الهيدروكربونات البترولية الموجودة بتركيزات أولية من عشرات الغرامات لكل كيلوغرام من التربة حركيات المرتبة الأولى مع نصف عمر حوالى سنتين. إن زراعة الأرض (Landfarming) هو أسلوب معروف لعلاج التربة الملوثة بالهيدروكربون.

7.17 معالجة المياه الجوفية Treatment of groundwater

1.7.17 معالجة نشطة Active remediation

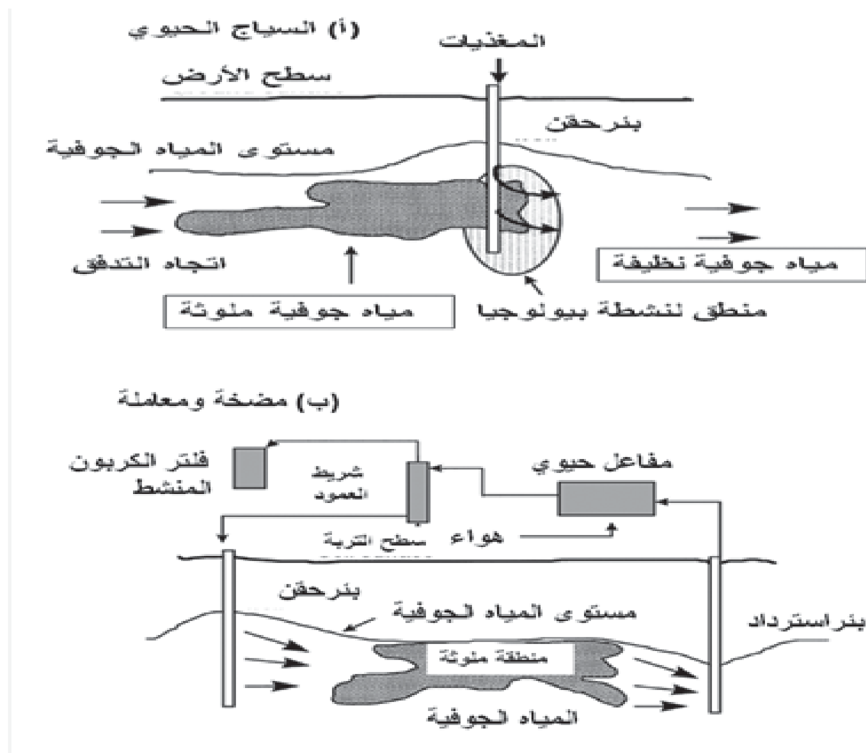
إن استراتيجية معالجة المياه الجوفية السائدة في الولايات المتحدة وأوروبا هي تطبيق لما يسمى تكنولوجياً الضخ والمعالجة (Pump-and-Treat). التي تستخدم التقنيات الفيزيائية والكيميائية لإزالة الملوثات في وحدات المعالجة فوق الأرض، عن طريق الكربون المنشط، وتجريد الهواء (Air stripping) مثلاً، في حين يتم استخدام المفاعلات البيولوجية في أقل من 10٪ من الحالات (الشكل 15.17). إن محدودية استخدام المعالجة البيولوجية هنا سببه الخبرة المحدودة، والبيانات المتاحة القليلة أو القبول المحدود للتكنولوجيا، وأيضاً الفشل في تحقيق المستويات اللازمة للتنظيف. ولعل أكبر الخبرات المكتسبة (إلى حدّ الآن) في تطبيقات المعالجة البيولوجية الواسعة النطاق خارج الموضع وفي الموقع كان التحلل البيولوجي للمواد الهيدروكربونية البترولية، التي تضم السلسلة المستقيمة والمتفرعة، والمشبعة، غير المشبعة والاليفاتية (Aliphatics) إلى الهيدروكربونات العطرية ذات الحلقات الأحادية، والمزدوجة والمتعددة. وفي الآونة الأخيرة، ومع أنه، تم تطوير أنواع جديدة من التصاميم التي تقضي على المذيبات متعددة الكلورينات والمواد العطرية كذلك، إلا أنه تبين على سبيل المثال، أن المفاعلات UASB الملقحة بحمأة الميثان الحبيبية أزالت الكلورات تماماً (> 99%) من مادة الأيثلين رباعية الكلور Tetrachloroethylene الحاضر في 4 ملغ/ لتر من المياه الجوفية الملوثة . وقد استخدمت الخلات (Acetates) كمصدر كربون ومانح للإلكترون فكانت تكاليف العملية تنافسية (1.2 دولار أمريكي لكل متر مكعب معالج من المياه)، هذا ويتم ترقية تكنولوجيا مفاعلات UASB حالياً بحمأة حبيبية تجمع بين البكتيريا اللاهوائية والهوائية لتسريع عملية التحلل.

لقد فشلت استراتيجية الضخ – المعالجة، في تحقيق أهداف التنظيف في معظم الحالات لما تتطلبه من فترات تنظيف طويلة. ومن بين 77 موقع ضخ-

ومعالجة، تم تقييمها مؤخراً من قبل لجنة تحت إشراف المجلس الأمريكي القومي للبحوث (NRC)، حققت ثمانية فقط منها أهداف التنظيف، فقد كانت البقية في أقصى مستويات التلوث بحسب منظمة قانون المياه الصالحة للشرب (SDWA). ومن ثمانية مواقع ناجحة، كانت ستة منها ملوّثة بالهيدروكربونات النفطية التي كان بالإمكان أيضاً إزالتها من خلال التوهين الطبيعي. واليوم (2005)، تستخدم استراتيجية "ضخ- ومعالجة، تكراراً، لعلاج الأيثر (Methyl tert,-butyl ether) الموجود أينما يخزن النفط في خزانات الوقود تحت الارض . لقد خلصت لجنة البحوث الوطنية الامريكية إلى أن طرق الضخ- والمعالجة غالباً ما تفشل في قدرتها على إزالة الملوثات من تحت السطح بسبب عدم انتظام مكونات تحت السطح، كوجود الشقوق، وانخفاض الطبقات المسامية، والمركبات المدمصة، وبطء النقل الكتلي تحت سطح الأرض. وحتى مع أفضل أساليب الاستخراج، في كثير من الأحيان لا يمكن تحريك سوى جزء صغير من الملوثات فيها، فيترك جزء كبير منها، متبقياً، في التربة . نتيجة لهذا الفشل، تحولت سياسات المعالجة والتطورات التقنية نحو زيادة استعمال ممارسات احتواء موضعية، على سبيل المثال السياج البيولوجي ((Biofencing) الشكل 15.17)، بدلاً من سيناريوهات المعالجة الكاملة. وفي الحالات التي يكون فيها العلاج الكامل ضرورياً، يتم تعيين أهداف تنظيف أقل صرامة، على أساس تقييم المخاطر، مع الأخذ في الاعتبار نوع استخدام الأراضي.

عدا عن المركبات المدروسة كثيراً، والمناقشة أعلاه في هذا الفصل، فإن هناك مجموعة من المركبات السامة موجودة عادة بمستويات ضئيلة، ولم يدرس مصيرها في التربة أو حركتها إلا قليلاً . مثال على ذلك مادة الديوكسين متعددة الكلور (Polychlorinated dioxin) والفيوران (Furan) التي يتم تشكيلها على نحو منتوجات جانبية لعمليات التركيب الكيميائي. وتصدر أيضاً عبر احتراق القمامة ونفايات الزيوت، والتربة الملوثة بالزيوت، والنفايات الكيميائية المحتوية على PCBs، ومن قبل مختلف العمليات الأخرى ذات درجة الحرارة العالية. وبسبب السمّيّة العالية

لبعض الديوكسين والفوران، فلهذه المركبات أهمية سمّيّة بيئية كبيرة. وقد حاولت البحوث والتطويرات الجارية الحدّ من تكوينها في المحارق وانبعاثها عبر الرماد المتطاير. مع ذلك، يبقى لتحلل هذه المركبات الطرق البيولوجية أهمية كبرى. في الواقع، لاسيما وأنها تكون موجودة في النفايات التي يصعب علاجها عن طريق الحرق (مثل التربة الملوثة والرواسب لنهرية). وهذه السموم موجودة أيضاً في الرماد المتطاير من المحارق، وتلك المودعة في مطامر القمامة، التي ورغم كل الاحتياطات، يمكن أن تلوث المياه الجوفية عن طريق الارتشاح (Leaching) .



الشكل 15.17 (أ) تستخدم تكنولوجيا المعالجة المسماة "ضخ ومعالجة" الآبار الاستردادية معادة التغذية (Recovery and recharge wells) التي تغسل المياه الجوفية حتى سطح الأرض حيث يتم التعامل معها عن طريق مجموعة من تقنيات فيزيائية وكيميائية وبيولوجية مختلفة . ويعاد حقن المياه المعالجة عدة مرات لتحسين استرداد الملوث. (ب) السياج البيولوجي (Biofencing)، من ناحية أخرى، ليس سوى أسلوب احتواء يتألف من إقامة منطقة ناشطة بيولوجياً إلى أسفل حافة انحدار منطقة المياه الجوفية الملوثة عن طريق حقن المغذي . فيما تدخل المياه الجوفية المضغوطة المنطقة النشطة بيولوجياً، يتم تحلل الملوثات بيولوجياً (Biodegraded).

2.7.17 التوهين الطبيعي والرصد

Natural attenuation and monitoring

لقد ولّد العديد من العوامل في الآونة الأخيرة مزيداً من الاهتمام في مجال تقنيات الرصد الجديدة. أحد هذه العوامل هو حقيقة أن تقنيات المعالجة (Remediation) غالباً ما تكون غير كافية لتلبية أهداف التنظيف الصارمة . وقد جعل هذا القيد المشرعين يعيدون تقييم مستويا ت الملوثات المستهدفة وجعلهم يفكرون في استخدام قائم على النتائج النهائية المؤسسة على المخاطر (Risk-based end-points) بدلاً من القيم المطلقة للنتائج النهائية . يتطلب المفهوم الجديد القائم على النتائج النهائية المؤسسة على المخاطر تطوير الأدوات التحليلية الجديدة التي تقيم تركيز الملوثات البيولوجية بدلاً من تركيز الملوثات الإجمالي. تعتمد هذه الأدوات الجديدة على اختبارات بيولوجية لأن الأساليب التحليلية التقليدية لا يمكنها تمييز الملوثات التي تتوفر للنظم البيولوجية من تلك التي توجد في أشكال خاملة أومعقدة، أو بأشكال غير مألوفة. إن تعريض التربة الملوثة لفترة نشاط جرثومي مكثف يمكن أن يحدّ من السمّيّة بعامل من 5 إلى 10 . ويمكن استخلاص هذه المعلومات عن السمّيّة البيئية بسهولة من خلال تشغيل اختبار بيولوجي بسيط على مياه رشح التربة (Soil leaches). ويستند نوع من الاختبار البيولوجي هذا إلى التألق البيولوجي Bioluminescence الطبيعي للكائنات البكتيرية اللميعة *(Photobacterium phosphoreum)*، الذي يستخدم، في اختبارات Microtox، Biotox و Lumistox. من ناحية أخرى هذه المقايسات ليست دقيقة ومحددة، لأن تثبيط الضوء سوف يحدث عند التعرض لأي مادة سامة. وهذا القيد تم التحايل عليه في فئة جديدة من أجهزة الاستشعار البكتيرية التي هي محددة لأنواع معينة من المواد السامة. وقد طورت على سبيل المثال، أجهزة استشعار بيولوجية تستطيع الكشف عن المعادن التي تتوفر في النظم البيولوجية بوضع الجينات لوكس (lux) من الــ *Vibrio fischeri* كجينات مراسلة (Reporter genes) تحت سيطرة الجينات المشتغلة في تنظيم مقاومة المعادن الثقيلة في

البكتيريا *Alcaligenes eutrophus*. تقوم السلالة المؤتلفة، عند الاختلاط بالتربة أو الماء الملوثين بالمعادن، بإرسال الضوء على نحو يتناسب مع تركيز المعادن المحددة المتوفرة بيولوجياً. ويقاس انبعاث الضوء بسهولة بواسطة مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer).

وهنالك عامل آخر مسؤول عن الاهتمام الأخير في أدوات الرصد الجديدة هو بطء تقنيات المعالجة وتكلفتها العالية. ويجري مناصرة نهج معالجة أكثر واقعية، يوصف بالتوهين الطبيعي (أو المعالجة البيولوجية الذاتية، Intrinsic bioremediation)، من قبل الوكالة الأميركية لحماية البيئة. تعتمد المعالجة البيولوجية الذاتية على العمليات الطبيعية لإزالة، أو عزل أو إزالة سموم الملوّثات من دون تدخل بشري . وقد لوحظت المعالجة البيولوجية الذاتية تطبق في معظم الأحيان في المياه الجوفية الملوثة بالهيدروكربونات . فإذا أكدت الأدلة أن موقعاً ما قد تحسن نتيجة المعالجة البيولوجية الذاتية، وأن مقدار تلوثه لم يعد يشكل خطراً على صحة الإنسان، قد تمنح وكالة تنظيم البيئة هذا الموقع صفة رصد فقط (Monitoring only status). وتتطلب هذه الاستراتيجية ببساطة مراقبة عن بعد من أجل متابعة موضعية لتراكيز الملوثات تحت السطح في ذلك الموقع .

ويمكن أن يتم الرصد من بعد بواسطة رادار مخترق للأرض، يرصد تحلل الملوثات القريبة من السطح على أساس الزيادة في الموصلية الكهربائية (Conductance) للمحلول الذي يرافق تحلل الهيدروكربونات أو المذيبات المكلورة . وهنالك أسلوب آخر مستخدم في المراقبة عن بعد يستعمل الكائنات الدقيقة المعدلة وراثياً التي تنتج ضوءاً رداً على وجود ملوثات محددة . وبما أن هذه الكائنات الدقيقة مرتبطة بخلية ضوئية متصلة برقاقة راديو، يتم تحويل إشارات الضوء إلى موجات راديو ترصد سيرورة التحلل عن بعد. ويمكن نشر وتوزيع هذه المجسّات في كافة المواقع الملوثة لرصد التقدم المحرز في عملية تحلل الملوثات.

8.17 قراءات إضافية Further reading

Baveye, Ph., J. - C. Block, and V. V. Goncharuk, *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*: *Practical Consequences for the Environment*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999.

Boon, N., J. Goris, P. de Vos, W. Verstraete, and E. M. Top, "Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-chloroaniline-degrading Comamonastestosteroni Strain, 12gfp. *Applied and Environmental Microbiology,* vol. 66 (2000), pp. 2906-2913.

Devinny, J. S. "Biological Treatment of Contaminated Air: Theory, Practice, and Everything in-Between," *Environmental Progress,* vol. 22, no. 2 (2003), J18-J19.

Farre, M. and D. Barcelo, "Toxicity Testing of Wastewater and Sewage Sludge by Biosensors, Bioassays and Chemical Analysis," *Trac-Trends in Analytical Chemistry,* vol. 22, no. 5 (2003), pp. 299-310.

Grady, L. C. P., G. T. Daigger, and H. C. Lim, *Biological Wastewater Treatment*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

Lendvay, J. M., F. E. Loffer, and M. Dollhopf [et al.], "Bioreactive Barriers: A Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation for Chlorinated Solvent Remediation," *Environmental Science and Technology,* vol. 37, no. 7 (2003), pp. 1422-1431.

Nivens, D. E., T. E. McKnight, and S. A. Moser [et al.], "Bioluminescent Bioreporter Integrated Circuits: Potentially Small, Rugged and Inexpensive Whole-Cell Biosensors for Remote Environmental Monitoring," *Journal of Applied Microbiology,* vol. 96, no. 1 (2004), pp. 33-46, 2004.

Sayler, G. S., J. Sanseverino and K. L. Davis, *Biotechnology in the Sustainable Environment*. New York: Plenum Press, 1997.

Schmidt, I., O. Sliekers, and M. Schmidt [et al.], “New Concepts of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater,” *FEMS Microbiology Reviews,* vol. 27, no. 4 (2003), pp. 481-492.

Verstraete, W. “Environmental Biotechnology for Sustainability,” *Journal of Biotechnology,* vol. 94, no. 1 (2002), pp. 93-100.

الفصل الثامن عشر

إنتاج مضادات الحيوية بالتخمير

Production of Antibiotics by Fermentation

ديريك جي. هووك **Derek J. Hook**

مستحضرات 3M الصيدلانية، الولايات المتحدة الأميركية

3M Pharmaceuticals, USA

1.18 المقدمة Introduction

لا يزال إنتاج مضادات الحيوية بالتخمير، إما للاستخدام المباشر في علاج الإنسان أو كمواد أولية في تصنيع مشتقات معدلة كيميائياً تُكوّن البنية الأساسية لمضادات الحيوية، ويشكل المساهمة الرئيسية في علاج أمراض الإنسان. هناك صنفان فقط من العوامل المصنعة كيميائياً لديهما حصة تسويق مهمة كمضادات حيوية وهما: السلفون أميدات Sulphonamide والفلوروكوينولونات Fluoroquinolones. وقد دخلا السوق حديثاً، بانتشارٍ متواضع. وهنالك صنف كيميائي جديد من مضادات الحيوية، وهو الأوكزازوليدينونات Oxazolidinones ، الذي يسوق بحرص بوصفه مضاداً حيوياً احتياطياً. ومن الواضح في بيئة التعويض الحالية، أنه من الصعب جداً لأي مضاد حيوية جديد من التنافس اقتصادياً مع عموم مضادات الحيوية Generic antibiotics مثل البيتا–لاكتام β-lactam، والماكروليدات Macrolides والتتراسيكلينات Tetracyclines، إلا إذا كان لديه الأفضلية من ناحية التميز في الاستخدام الطبي، والكلفة المنخفضة.

إن استمرار تطور الكائنات المقاومة لمضادات الحيوية بدأ يكشف عجز الأدوية المتوفرة لعلاج الإصابات المكتسبة عن طريق المستشفيات والمجتمع. لذلك، فإن التركيز في اكتشاف مضادات حيوية واسعة الطيف قد مال بعيداً باتجاه كينونات جديدة تستهدف الكائنات المقاومة. وفي حيز التسويق، باتت فرص تسويق الأدوية الجديدة ذات الطيف الضيق تتقلص، مما ينعكس على قرارات العمل على الاستمرار في محاولات اكتشاف أدوية جديدة. إضافة إلى ذلك، إن التشديد على حفظ الكلفة في الصناعة المتعلقة بالرعاية الصحية مستمر في توجيه هذه الصناعة نحو توسع استخدام عموم مضادات الحيوية واسعة الطيف حيثما أثبتت فعاليتها. إلا أن هذا (حفظ الكلفة) أدى إلى معضلة في الصناعة الدوائية مفادها الجدوى الاقتصادية من الاستمرار في محاولات اكتشاف مثل هذه الأدوية في واقع قلّة العائد من الاستثمار في هذا المجال. كما قاد هذا بعض شركات الأدوية إلى التخلي كلياً عن اكتشاف عقاقير مضادات الحيوية، لكنه من جهة أخرى فتح المجال لشركات التقانة الحيوية التي يمكن أن تكون مستعدة للمخاطرة والقبول بأسواق ذات أحجام أصغر. والمثال الحديث على ذلك هو القرار الذي اتخذته شركة بريستول–ماير سكويب Bristol-Myer Squibb في أواخر عام 2004 بإغلاق خط إنتاج مضادات الحيوية في منشأتها في سَيْراكوس Syracuse، نيويورك، لأسباب اقتصادية.

2.18 لمحة عامة عن أصناف مضادات الحيوية

Overview of antibiotic calsses

لقد قدرت المبيعات العالمية لمضادات الحيوية ومضادات الفطريات المستخدمة لعلاج الإنسان في عام 2001 ما يقارب 26 بليون دولار أمريكي، منها 19 بليون دولار لمضادات الحيوية التي تؤخذ عن طريق الفم. وبالرغم من انتهاء صلاحية براءات الاختراع لمضادات الحيوية العشرين الأكثر مبيعاً، يستمر سوق مضادات الحيوية العالمي بالاتساع، والذي يحركه بشكلٍ أساسي هو الاستخدام المتزايد لمضادات الحيوية في الهند وآسيا. ولكن، كميات أكبر من ذلك بكثير (أطنان) من مضادات الحيوية تستخدم كعوامل غير علاجية في الزراعة. من

الصعب الحصول على أرقام دقيقة، ولكن يبدو أن حوالى 7500–12500 طن من مضادات الحيوية تستخدم من قِبل الولايات المتحدة الأمريكية وحدها في مجال زراعي غير علاجي، خاصةً كمحفزات نمو في الدواجن، والخنازير والأبقار. بعض هذه المضادات مكوّن من أصناف دوائية قليلاً ما تستخدم في علاج الإنسان. وفي أوروبا، تغيرت هذه الحالة مع إدخال الاتحاد الأوروبي حظراً على استخدام العديد من مضادات الحيوية المستخدمة لعلاج الإنسان كعوامل محفزة للنمو، وقد تراجعت نسبة مبيعاتها لمضادات الحيوية، على الرغم من استمرار استخدام العديد منها لأهداف بيطرية.

يقسم سوق الأدوية المضادة للبكتيريا إلى قسمين متساويين تقريباً بين مضادات بيتا–لاكتام الحيوية والأصناف الأخرى من مضادات الحيوية. ويقسم سوق بيتا–لاكتام إلى السيفالوسبورينات Cephalosporins (30%) والبينيسيلينات Penicillins (7%) ومضادات الحيوية الأخرى من بيتا–لاكتام (15%). أما الفلوروكوينولونات Fluoroquinonlones فتشكل 24% من السوق، والماكروليدات Macrolides حوالى 20%. وتشكل الأوكزازوليدينونات Oxazolidinones، والستريبتوغرامينات streptogramins، والتتراسيكلينات tetracyclines، والغلايكوزيدات الأمينية Aminoglycosides، والكربابينيمات Carbapenems الـ 4% المتبقية. وفي ما يلي عرض لجميع الأصناف الأساسية لمضادات الحيوية، لكن تاريخ استخدامها وطرق إنتاجها والتقانة الحيوية لتحسين إنتاجها والمقاربات المستخدمة لتحديد كيفية نشوء مقاومة البكتيريا لها مبينة بوضوح في هذه الدراسة من خلال تاريخ تطوير البينيسيلينات والسيفالوسبورينات كعوامل علاجية. وبالفعل، لا تزال هذه العوامل الدوائية (من مضادات الحيوية) تمثل علاجاً مهماً للإصابات البكتيرية بسبب تطوير أشكالٍ هامة منها ذات طيف واسع، وتعطى عن طريق الفم، ورخيصة في الجيلين الأساسين الثاني والثالث .

بشكل عام، يمكن تقسيم مضادات الحيوية الناجعة تجارياً إلى بضعة أصنافٍ رئيسية. يُبنى هذا التقسيم عادة على أساس مسارات التصنيع الحيوي

والمركبات السالفة المستخدمة من قِبل الكائنات في تصنيع هذه المضادات التي غالباً ما تُتبع بتعديلات تصنيع حيوي محددة وفريدة. وتضم الأصناف الرئيسية:

- مضادات حيوية مشتقة من مركبات سالفة من أحماض أمينية تُصنّع إما من خلال مسار تصنيعي غير ريبوزومي (بيتا-لاكتام، بيبتيدات حلقية، بيبتيدات دهنية) أو من خلال مسار تصنيعي ريبوزومي طبيعي (النيسينات Nisins).
- مضادات حيوية مصنعة من السكريات (الغليكوزيدات الأمينية)؛
- مضادات حيوية مشتقة من مركبات سالفة من أحماض دهنية (مضادات عديدات الكيتايد Polyketides الحيوية) مثل التتراساكلينات Tetracyclines، والمايكروليدات Microlides ، والبوليئينات Polyenes.

وغالباً ما تتلاقى هذه المسارات لتنتج أصنافاً هجينة من مضادات الحيوية، مثلاً البيبتيدات السكريةGlycopeptides ، التي تتألف من هيكل بيبتيدي أساسي معدل بإضافة ضرورية لثمالات من السكر.

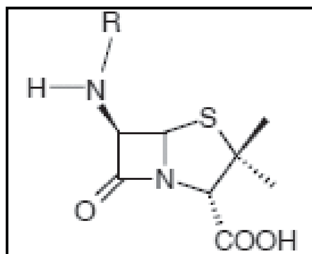
1.2.18 لمحة عامة عن مضادات بيتا-لاكتام الحيوية

Overview of β-lactam antibiotics

هناك صنفان رئيسيان من مضادات بيتا-لاكتام الحيوية المنتَجة جرثومياً، التي لا تزال تصنّع بكميات، وهما البنيسيلينات Penicillins والسيفالوسبورينات Cephalosporins. إن مضادات بيتا-لاكتام الحيوية (البنيسيلين، والأمبيسيلين، والسيفالوسبورينات، إلخ..) هي مضادات ضيقة إلى متوسطة الطيف، وذلك لأن بعضها فعّال فقط ضد كائنات إيجابية الغرام في حين يمكن لبعضها الآخر أن يقتل أيضاً أنواع محددة من بكتيريا سلبية الغرام. وبالرغم من هذه المحدودية، فإن استخدامها واسع الانتشار لأمانها ولتطوير الأجيال الأخيرة منها ذات طيف أوسع في الفعالية المضاد للجراثيم. لقد اعتُمد تطوير نطاق واسع من البينيسيلينات والسيفالوسبورينات في الاستخدام الطبي لدى التلاعب الكيميائي اللاحق في النُّوى

الأساسية المكونة لهذه مضادات الحيوية. وقد استخدمت عمليتان حيويتان رئيسيتان في الإنتاج الصناعي لأشكال متنوعة من البنيسيلين والسيفالوسبورين:

- تطوير برامج تحسين السلالة، الذي يؤدي إلى سلالات ذات إنتاج صناعي معدل من الكائنات التي بإمكانها اقتصادياً إنتاج الأطنان من مضادات الحيوية المطلوبة في التلاعبات الكيميائية اللاحقة لكميات كبيرة من مضادات الحيوية.
- تطوير طرائق قطع أنزيمية فعّالة واقتصادية على مستوى صناعي من أجل إزالة السلاسل الجانبية غير المرغوبة من المواد المُعدّة للإنتاج بكميات كبيرة، والحصول على النواة الأساسية المُعدّة للتلاعب الكيميائي اللاحق. لقد قلّلت هذه الطرق الأنزيمية من استخدام المحاليل الصناعية بقدر مهم، وبالتالي ساهمت بشكل أساسي في إنقاص الكلفة المخصصة لمعالجة مجاري الفضلات الناتجة من معامل التصنيع.

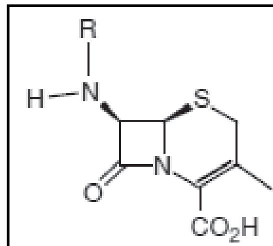


الشكل 1.18: بُنية البينام penam ثنائية الحلقة.

2.2.18 البينيسيلين Penicillins

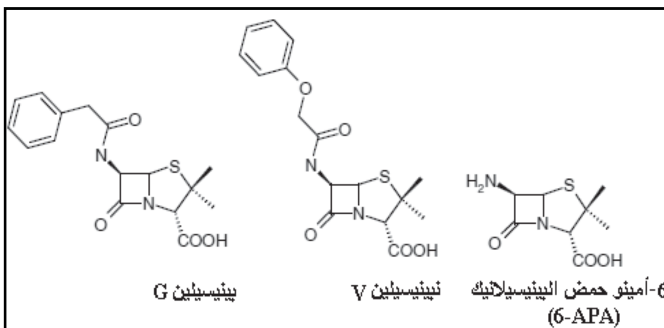
يعد اكتشاف البينيسيلين أول اكتشاف لمضادات الحيوية المنتجة جرثومياً. ومجاراةً للطلب، وخصوصاً خلال وبعد الحرب العالية الثانية، تم تطوير عملية تخمير منغمرة لإنتاج الصنفين الأساسين من مضادات الحيوية وهما، البينيسيلين G والبينيسيلين V . يشترك البينيسيلين G وV ببنية حلقية ثنائية، والقسم بيتا–لاكتام من الجزيء هو المسؤول عن الفعالية البيولوجية لهذه المركبات. إن التغيرات في المجموعة R الموجودة على السلسلة الجانبية هي المسؤولة عن اختلاف طيف

التأثير المضاد للجراثيم، وعن الخواص الحرائكية الدوائية Pharmacokinetics أيضاً. فمثلاً، البينيسيلين G حساس للحموضة (غير مستقر في البيئة الحمضية) ولا يمكن إعطاؤه عن طريق الفم لأنه يتحطم بتـــاثير حموضة المعدة، لذلك فهو يعطى عن طريق الحقن. لكن البينيسيلين V ثابت تحت الظروف الحمضية، وبذلك يمكن إعطاؤه عن طريق الفم.



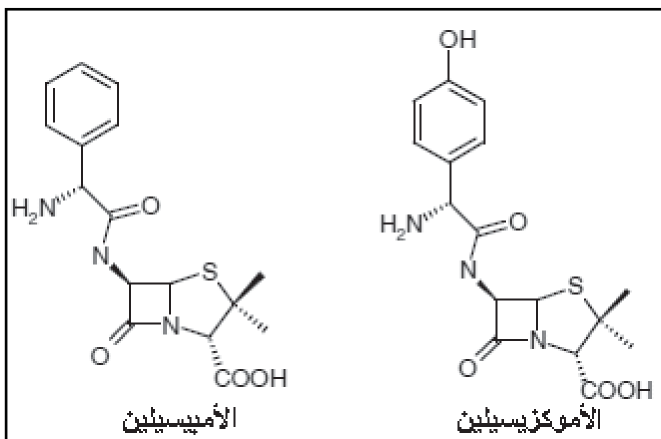
الشكل 2.18: بُنية السيفيم Cephem ثنائية الحلقة.

لقد أُثبِت منذ وقتٍ مبكر بأنه يمكن توجيه عملية التصنيع الحيوي عند الكائنات المنتجة نحو إنتاج بنيسيلينات ذات سلاسل جانبية مختلفة عن طريق تغييرات في مكونات أوساط التخمير. يُنتج كلٍّ من البينيسيلين G و V بكميات كبيرة عن طريق إضافة إما فينيل حمض الخل Phenylacetic acid أو فينوكسي حمض الخل Phenoxyacetic acid ، على التتالي أثناء عملية التخمير، والأميد الذي يتولد على حلقة البيتا–لاكتام يعطي البينيسيلين بنيته المميزة. لكن هذه المقاربة تقتصر على مجال ضيق من الأحماض العضوية فهناك حدود لمقدرة الكائنات المنتجة على استبدال مركبات سالفة مرغوبة أكثر تعقيداً ضمن هذا القسم من جزيء اللبينيسيلين. وهذا يعود إلى عدم قدرة أنزيمات الأسْيَلة Acylating enzymes على قبول هذه المانحات من المركبات السالفة.



وبغية التغلب على هذه القيود التي تعيق عملية التخمير، تم تطوير مقاربة شبه تصنيعية مختلفة لإنتاج بينيسيلينات ذات حيوية أوسع وذات ثباتية حيوية وكيميائية.

تقع الفعالية الحيوية الأساسية للبينيسيلين في القوام الكيميائي الثنائي الحلقة المبين في الشكل 1.18. ويعرف هذا القوام باسم نواة "بينام Penam". تصنع بينيسيلينات جديدة عن طريق أخذ هذه النواة الأساسية على صورة 6–أمينو حمض البينيسيلانيك 6- amino pencillanic acid (6-APA) وربطها كيميائياً بسلاسل جانبية جديدة (R= في الشكل 1.18) في موقع مجموعة الأمينو الحرة الموجودة على النواة 6-APA . على نحو مماثل، يكمن أساس (جوهر) الفعالية الحيوية للسيفالوسبورينات في القوام الكيميائي الثنائي الحلقة المبين في الشكل 2.18. ويعرف هذا التركيب باسم نواة "السيفيم Cephem". وبطريقة مماثلة، تصنع سيفالوسبورينات جديدة بأخذ هذه النواة الأساسية في صورة 7– أمينو حمض ديساسيتوكسي سيفالونسبوريك 7-aminodesacetoxy Cephalonsporic acid (7-ADCA) وربطها كيميائياً بسلاسل جانبية جديدة (R= في الشكل 2.18) في موقع مجموعة الأمينو الحرة على النواة7-ADCA.
ويشار أيضاً إلى القوامات هذه التي تضم جوهر الفعالية الحيوية للجزيء باسم "حوامل الخاصية الدوائية Pharmacophores". وقد سمح هذا بتطوير بينيسيلينات جديدة تمتلك طيف فعالية بيولوجية واسعاً، يغطي كلاً من إيجابية الغرام وسلبية الغرام، ومقاومة ضد أنزيمات بكتيرية تدعى أنزيمات بيتا–لاكتاماز Beta-lactamases التي تحطم مضادات الحيوية قبل أن تصبح فعّالة في قتلها للبكتيريا.
كان الأمبيسيلين والأموكزاسيلين من أوائل بينيسيلينات الجيل الثاني، ولم يكونا يمتلكان فعالية ضد بكتيريا موجبة الغرام فقط بل أظهرا أيضاً فعالية يُعْتَدُّ بها ضد أنواع سالبة الغرام المهمة طبياً، مثل بكتيريا *المُسْتَدْمِيَةُ النَّزْلِيَّة Haemophilus influenzae*، و*القولونية الاشريكية Esherichia coli*، و*المُتَقِّلبة الرائعة Proteus mirabilis*.

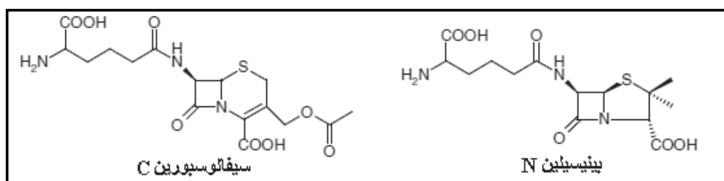


وكمثال آخر للتعاون بين منتج التخمير والعملية الكيميائية هو استخدام 6-APA كمادة خام لإنتاج ليس فقط البينيسيلينات شبه المصنعة، وإنما من أجل الإنتاج المتوازي للنواة 7-ADCA المشكّلة للسيفالوسبورينات، وذلك من خلال توسع الحلقات الكيميائية من نواة خماسية الحلقة "البينام Penam" إلى النواة سداسية الحلقة "سيفيم Cepem" (انظر في الأعلى الشكلين 1.18 و 2.18). تؤدي إضافة سلاسل جانبية متنوعة إلى مجموعة الأمينو الموجودة على حلقة السيفالوسبورين إلى الحصول على عدد ضخم من سيفالوسبورينات الجيلين الثاني والثالث.

3.2.18 السيفالوسبورينات Cephalosporins

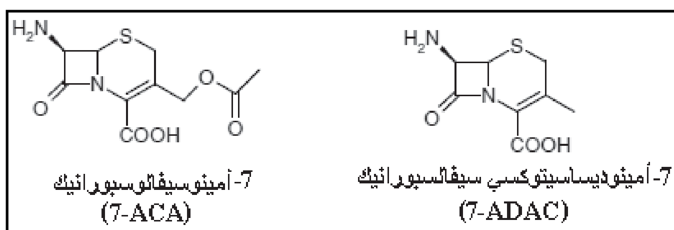
لقد اكتُشف صنف السيفالوسبورين التابع لمضادات بيتا–لاكتام الحيوية بالصدفة من مياه المجارير في جزيرة سردينيا، إيطاليا. وقد أعطى الكائن المجهري الذي ينتج هذه المركبات (صُنِّف أساساً على أنه تابع لفطور من جنس رأسية الأبواغ Cephlosporium ، ولكن أعيد تصنيفه فيما بعد ليصبح *Acremonium chrysogenum)*، مركبان محبان للماء من مجموعة بيتا–لاكتام، أحدهما كان البينيسيلينN penicillinN، والآخر كان سيفالوسبورين C cephalosporin C، وقد أبديا في الواقع فعالية ضعيفة مع أنها فعالية تغطي كائنات إيجابية الغرام وسلبية الغرام. إن اكتشاف صنف جديد من مضادات الحيوية المتعلق بمضادات بيتا – لاكتام فتح إمكانيات تصنيع سيفالوسبورينات شبه تصنيعية

كما أشير أعلاه. والسيفالوسبورين C هو أكثر استقراراً من البينيسيلين، N مما أتاح تطوير برامج تحسين سلالات صناعية تهدف إلى تطوير سلالات من السيفالوسبوريوم Cephalosporium تنتج تراكيز عالية من السيفالوسبورين C.



وبمجرد الحصول على كمية من الجزيء الأصل من السيفالوسبورين، C ، فإنه من الضروري عندها تطوير تقنية لنزع السلسلة الجانبية. وتُتَّبع مقاربتان من أجل إنتاج نواة سيفالوسبورين:

- نزع مجموعة الأميد أنزيمياً من السلسلة الجانبية لحمض الأمينو–أديبيك Amino-adipic acid للحصول على الغلوتاريل سيفالوسبورين Glutaryl cephalosporins، التي تخضع بعدها إلى إزالة مجموعة الأسيل للحصول على حمض 7–أمينو سيفالوسبوريك 7-aminocephalosporic acid (7-ACA).
- توسيع حلقة البينيسيلين كيميائياً إلى حلقة سيفالوسبورين، وذلك مروراً بمركب سلفوكسايد الوسيط Sulfoxide intermediate للحصول على الـــ 7-ADAC . ويمكن في ما بعد أسْيَلَة (إضافة مجموعة أسيل Acylation) هذا المركب بنفس الطريقة المتبعة لإنتاج البينيسيلينات شبه المصنّعة.



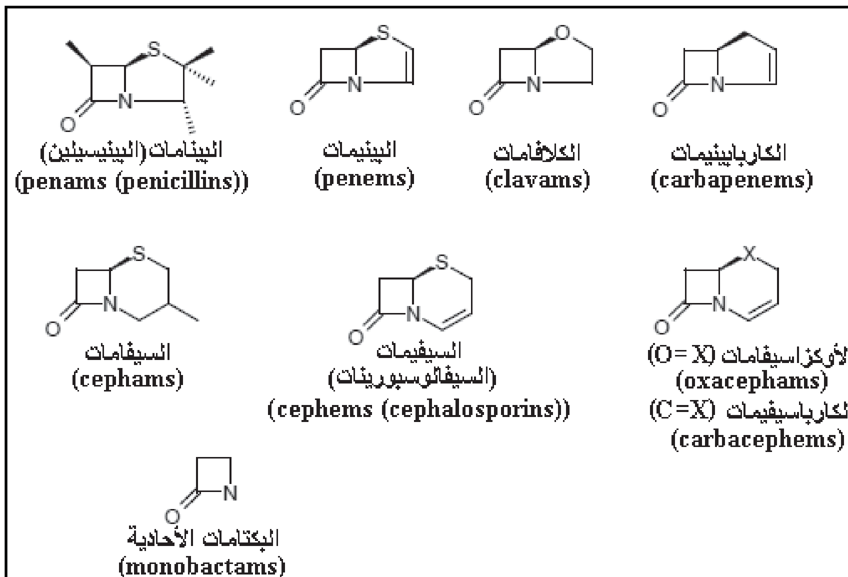
تصنف السيفالوسبورينات إلى أجيال على أساس الميزات العامة لفعاليتها المضادة للجراثيم. تضم سيفالوسبورينات الجيل الأول عوامل ذات فعالية جيدة ضد بكتيريا إيجابية الغرام (*العنقوديات الذهبية S. Aureus*، *والمكورات العنقودية*

Streptococci من المجموعة A، *والعِقَدية الرئوية Streptococcus pneumonia*)، بالإضافة إلى فعالية بسيطة ضد كائنات سالبة الغرام. أما سيفالوسبورينا الجيل الثاني فتمتلك فعالية فعّالة زائدة ضد مجموعة محددة من الممرضات سلبية الغرام، وتضم *المُستَدْمية النَذَرْلية Haemophilus influenzae*، *والنَّيسَرِيَّةُ السِّحائيَّة Neisseria meningitidis*، *والموراكسيلة Moraxella catarrhalis*) . وسيفالوسبورينات الجيل الثالث هي بشكل ما أقل فعالية ضد المكورات إيجابية الغرام، ولكنها فعّالة أكثر بكثير ضد الكائنات المعوية سلبية الغرام .

4.2.18 أصناف أخرى من صادات بيتا–لاكتام

Other beta-lactam classes

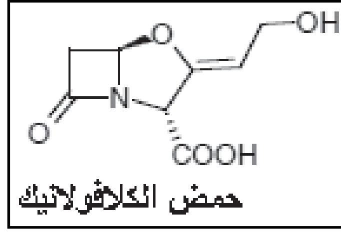
قادت غربلة واسعة النطاق على مدى الخمسين سنة الماضية إلى اكتشاف عدد من الأصناف الأساسية من مضادات بيتا–لاكتام الحيوية، التي تُبدي جميعها أطياف مضادة للجراثيم وصفات فيزيائية–كيميائية فريدة. وقد كان الدافع إلى معظم هذا الجهد هو الحاجة الدائمة إلى التفوق على آليات تطور المقاومة لدى البكتيريا الممرضة. والتراكيب التي تشكل جوهر أصناف ببتا–لاكتام الرئيسية مبينة أدناه:



5.2.18 مثبطات بيتا–لاكتاماز β-lactamase inhibitors β-lactamase

هناك مقاربة تم اتخاذها من أجل تعزيز فعالية البينيسيلينات التي فقدت فعاليتها بسبب إنتاج أنزيمات البيتا–لاكتاماز من قبل البكتيريا التي كانت سابقاً حساسة للبينيسيلين. تقوم أنزيمات بيتا–لاكتاماز بتحطيم حلقة البيتا–لاكتام في مضاد بيتا–لاكتام الحيوي (البينيسيلين) قبل أن يصل إلى أنزيمات جدار الخلية المستهدفة مما يجعله غير فعّال. ومن إحدى الاستراتيجيات التي اتبِعت لحل هذه المشكلة كانت غربلة المركبات والتعرف على تلك التي تثبط فعل أنزيمات بيتا–لاكتاماز، ولا تُبدي بحد ذاتها أية فعالية هامة مضادة للبكتيريا. في النهاية، تم التعرف على مركب حمض الكلافولانيك Clavulanic acid كمركب فعّال لهذا الغرض.

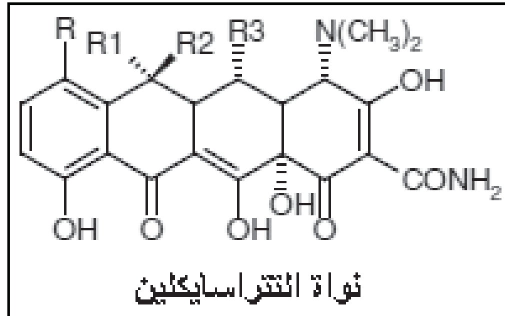
ولحسن الحظ، فقد تبين أن هذا المركب آمن للاستخدام البشري، وهو يستخدم مندمجاً مع الأموكسيسيلين Amoxicillin تحت الاسم التجاري الاوغمانتين Augmentin™. يستخدم الأوغمانتين لعلاج أنواع مختلفة من الإصابات البكتيرية مثل التهاب الجيوب، والالتهاب الرئوي، وإصابات الأذن، والتهاب القصبات، وإصابات المجاري البولية والجلد. وكما يظهر من بنية الجزيء (حمض الكلافولانيك)، فهو يمتلك بنية جوهرية ثنائية الحلقة شبيهة جداً بتلك الموجودة في البينيسيلين. وقد مهّد هذا الدمج العلاجي الطريق لاستخدام العلاج المندمج ذي الوجهة المحددة. ومن المثير للاهتمام أن الكثير من السيفالوسبورينات هي أيضاً عرضة للتفكك من قبل أنزيمات البيتا–لاكتاماز (وهي أنزيمات البينيسيليناز Pinicillinase والسيفالوسبوريناز Cephalosporinase) التي تنتجها الكائنات المقاومة للسيفالوسبورينات، لكن لم يتم حتى الآن تطوير مثبطات للسيفالوسبوريناز شبيهة من أجل تفعيل هذا الصنف من الضادات الحيوية (السيفالسبورينات)، مما يترك باب التحدي مفتوحاً أمام علماء التقانة الحيوية في المستقبل للعمل على إطالة عمر هذه مضادات الحيوية.



حمض الكلافولانيك

6.2.18 التتراسايكلينات Tetracyclines

وهي صنف هام من مضادات الحيوية الواسعة الطيف، تستخدم بشكل واسع لعلاج إصابات الإنسان وفي الزراعة والطب البيطري. وهي فعّالة ضد العديد من الإصابات البكتيرية، الموجبة والسالبة الغرام، كما أنها مناسبة لعلاج الالتهابات الريكيتيسية Reckettisial infecions، والمُتَدَثِّرِيَّة Chlamydial، والمفطوراتMycoplasmal، وبعض الإصابات الفطرية. ونظراً إلى امتلاكها هذا الطيف الواسع من الفعالية، فهي تدمر الكائنات المجهرية الطبيعية الموجودة في الأمعاء Micobiota وغالباً ما تنتج اضطرابات مَعِدية معوية حادة. بشكلٍ خاص، يُستخدم أوكسي تتراساكلين Oxytetracyclin، لكل من علاج الالتهابات عند الحيوانات وتحفيز النمو. كما استُخدم أيضاً في وقاية النبات سابقاً. ومؤخراً اقترحت هذه المجموعة من مضادات الحيوية لعلاج الجمرة الخبيثة، وتقرّحات المعدة، لأنها تبدي فعّالية ضد بكتيريا *Helicobacter pylori* . وبسبب مسألة تطور مقاومة مضادات الحيوية لدى ممرضات الإنسان فقد كان هناك تحرك باتجاه اقتصار استخدام التتراسايكلينات لتحفيز نمو الحيوانات ووقاية النبات، وبشكل خاص في أوروبا.



نواة التتراسايكلين

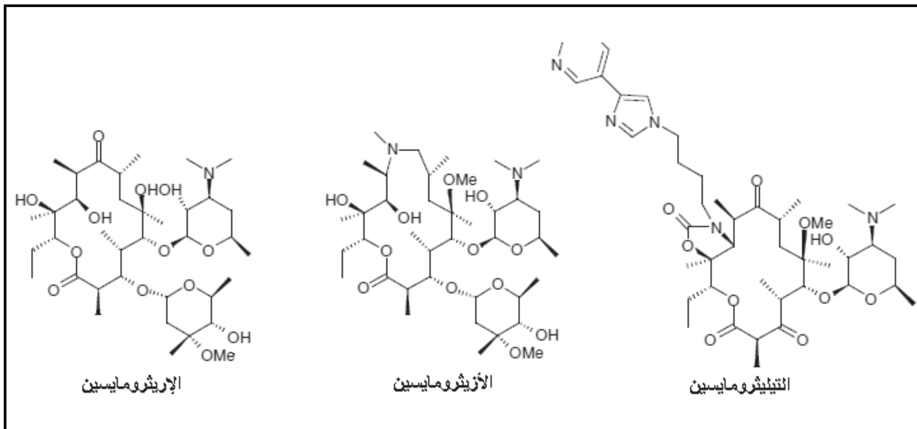
مضاد الحيوية	R	R1	R2	R3
كلوروتتراسايكلين Chlorotetracycline	Cl	CH_3	OH	H
أوكسيتتراسايكلين Oxytetracycline	H	CH_3	OH	OH
تتراسايكلين Tetracycline	H	CH_3	OH	H
دوكسيسايكلين Doxycycline	H	CH_3	H	OH
مينوسايكلين Minocycline	$N(CH_3)_2$	H	H	H

تتشكل هذه التتراسايكلينات عبر مسار التصنيع الحيويي لعديدات الكتايد polyketide. يحتوي الكلوروتتراسيكلين في بنيته على ذرة الكلور، التي يمكن زيادة كميتها عن طريق التخمير الموجَّه بإضافة أيونات الكلور إلى وسط التخمير. إن إنتاج الكائنات يمكن أن يكون موجهاً نحو إنتاج التتراسايكلين وحده وذلك عن طريق حذف الجين المسؤول عن الكَلْورة، في حين يُنتَج كلٌّ من الدوكسيسايكلين والمينوسايكلين بواسطة تعديلات كيميائية للكلوروتتراسايكلين، أو الأوكسيتتراسايكلين، أو التتراسايكلين.

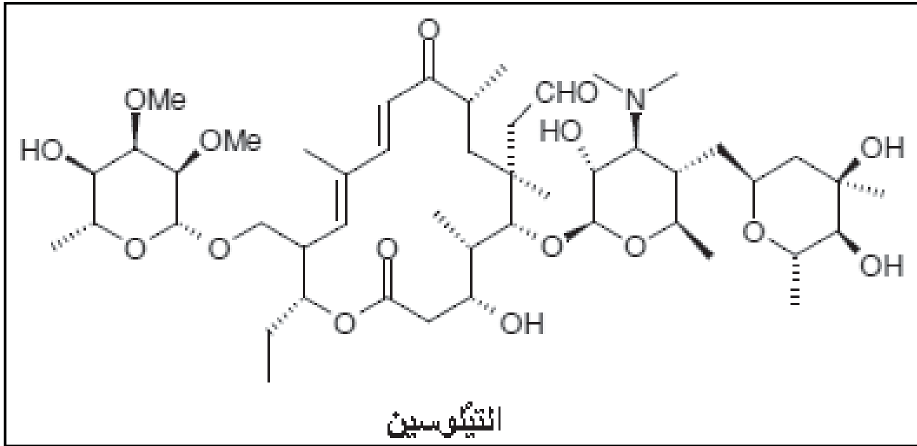
7.2.18 الماكرولايدات Macrolides

الماكرولايدات هي مجموعة أخرى من مضادات الحيوية الهامة وهي تتشكل من خلال دمج مسار التصنيع الحيوي لعديدات الكتايد Polyketides وإضافة سكر استثنائي (غير عادي). هذه المجموعة من مضادات الحيوية مطواعة جداً للتلاعب الجبني عند الكائنات المنتجة لها، وذلك بواسطة طرائق تقليدية بغية تحسين العطاء قديماً، أما مؤخراً فبواسطة تطبيق معرفتنا بمجموعات الجينات المسؤولة عن تصنيع عديدات الكتايد وكيفية تنظيم تصنيعها الحيوي من خلال ما هو منتج من معقدات

متعددة الأنزيمات. تمتلك الماكرولايدات الشائعة الاستخدام في علاج الإنسان حلقات لاكتون Lacton ضخمة مؤلفة من 12، أو 14، أو 16 ذرة كربون. وهي فعّالة ضد بكتيريا موجبة الغرام من جنس *المفطورة Mycoplasma والفَيلَقيَّة Legionell* .
وقد تم الآن تعزيز الفعالية الطبية لمضادات الحيوية الأساسية التابعة لصنف الماكرولايدات، مثل الإريثرومايسين Erythromycin، والكلاريثرومايسين Clarithromycin، والأزيثرومايسين Azithromycin (زيثروماكس Zithromax)، التي تنتج من طريق تعديل كيميائي على نواة الماكرولايد التي تشكل جوهر الإريثرومايسين بإضافة الكيتولايدات الأكثر فعالية وذات الطيف الأوسع (فهي–مضادات الماكرولايد الأساسية– عبارة عن مشتقات لماكرولايدات ذات حلقات تمتلك 14 ذرة وتتميز بوجود مجموعة كيتو على ذرة الكربون في الموقع 3)، ومثالها التَليثرومايسين Telithromycin.



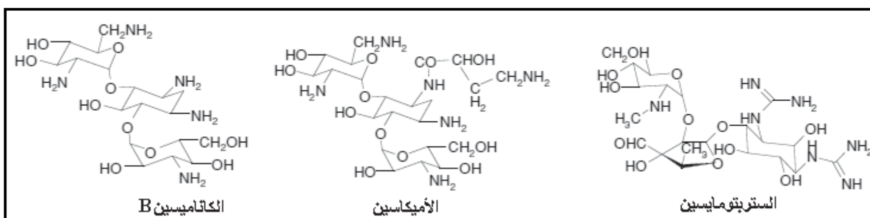
إن التَيْلوسين Tylosin هو ماكرولايد ذو حلقة مؤلفة من 16 ذرة، ويستخدم بشكل واسع على الحيوانات في العلاج البيطري وتحفيز نموها، وكما يستخدم أيضاً في وقاية النبات. مرة ثانية، لم تتم الإجابة بشكل مرضٍ بعد عمّا إذا كان مخزون السلالات المقاومة للماكروليدات والممرضة للإنسان هو بسبب استخدام هذا الماكرولايد المنتمي إلى جزيئات تستخدم في علاج الإنسان أو افتقار الممارسة الطبية للماكرولايدات المرخص لها لعلاج الإنسان.



التيلوسين

8.2.18 الغلايكوزيدات الأمينية Aminoglycosides

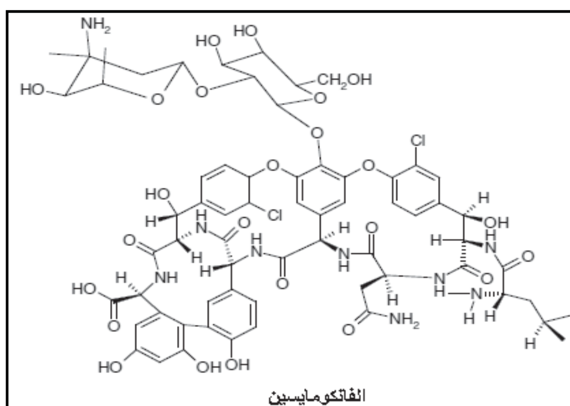
كانت الغليكوزيدات الأمينية من أوائل أصناف مضادات الحيوية التي تم اكتشافها بعد اكتشاف فليمنغ (Fleming) المبكر للبنيسيلين العام 1927. بدأ واكسمان (Waksman) برنامج غربلة لمستخلصات من التربة ما بين أواسط وأواخر الثلاثينيات من القرن الماضي، واكتشف الستريبتومايسين Streptomycin، وهو صنفٌ جديد من مضادات الحيوية المكوّنة من جزيئات سكر استثنائية (غير عادية) مرتبطة ببعضها البعض. وبالرغم من امتلاكها طيفاً واسعاً من الفعالية المضادة لجراثيم سلبية الغرام، فإن العائق الأساسي في هذه المجموعة يكمن في حقيقة أنها غير متاحة حيوياً عن طريق الفم، ويجب إعطاؤها عن طريق الحقن. بالإضافة إلى ذلك، تبدي هذه المركبات دليلاً علاجياً ضيقاً مع ظهور تأثيرات عكسية عند جرعات قريبة من الجرعة العلاجية. وبالرغم من هذا، كانت هذه المركبات تعتبر حتى فترة قريبة، آخر خط دفاعي في العلاج ضد الكائنات المقاومة. وبسبب بنيتها المعقدة فهي تنتج حصراً عن طريق التخمير مع أنه تم إنتاج أشكال شبه مصنعة لمضادات الحيوية الأصلية من أجل التغلب على آليات المقاومة الأنزيمية لدى البكتيريا التي تضم أسْيَلة العديد من مجموعات الأمينو أو فسفرة الأجزاء السكرية من هذه الجزيئات. وهكذا، حُلّت المسألة بالمركب المشتق شبه المصنع، أميكاسين (Amikacn) الذي يتم الحصول عليه من الكنامايسين B (B Kanamicin).



الكانامايسين B   الأميكاسين   الستربتومايسين

9.2.18 الببتيدات السكرية Glycopeptides

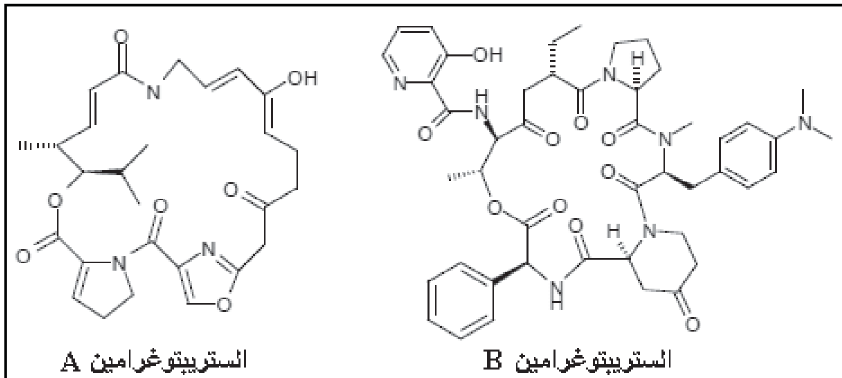
يتالف هذا الصنف الهام من المضادات الحيوية من جوهر أمينُوغلْيكُوزيدي مشتق من تكاثف سبعة أحماض أمينية عطرية معدلة، أو استثنائية (غير عادية)، أو من خليط أحماض أمينية مفتوحة (ذات سلاسل مفتوحة) وأخرى عطرية، مع استبدال إضافي لسكريات أمينية لتعطي مضادات الحيوية الأصل. وفي حين تضم هذه المجموعة عدة مئات من المركبات، فإن أهمها هو الفانكومايسين (Vancomycin). وحتى فترة قريبة كانت الببتيدات السكرية خط الدفاع الأخير ضد الجراثيم المقاومة للأدوية. إلا أنه تظهر الآن كائنات مقاومة للببتيدات السكرية في المحيط الطبية. فكما في حالة البيتا–لاكتمات والماكرولايدات، أدى الاستخدام في الحيوانات للببتيدات السكرية المستخدمة في علاج الإنسان، كالأبوفارسين (Apoarcine)، إلى الاشتباه بأن الكائنات المقاومة للببتيدات السكرية والمتولدة بالتعرض للأبوفرسين قد حولت آلية المقاومة لديها إلى المحيط الطبي (أي مضادات الحيوية الطبية). إن الكائن المستخدم في الإنتاج التجاري لهذه المضادات هو *Amycolotopis orientalis*، حيث تُستخدم الببتيدات السكرية الأصل، إما كما هي أو كمشتقات معدلة شبه مصنعة.



الفانكومايسين

10.2.18 الستريبتوغرامينات Streptogramins

هي واحدة من الصنفين الجديدين من مضادات الحيوية المنتجة جرثومياً التي طرحت في السوق في السنوات القليلة الماضية، وهي غير عادية من حيث المادة المعطاة في العلاج (السينرسيد Synercid™) التي هي حصيلة دمج مركبين يمتلكان بنيتين مختلفين تماماً من الستربتوغرامينات، وهما A وB . الستربتوغرامين A هو ماكرولاكتون حلقي متعدد ذو عدة روابط ثنائية، والستربتوغرامين B هو دبسيبيبتايد (Depsipeptide) حلقي. يمتلك كلٌّ من هذين الصادين منفرداً خاصية الحدّ من نمو البكتيريا، ولكن عند جمعهما معاً فإنهما يبديان فعالية قاتلة للبكتيريا. يُعطى هذا المضاد الحيوي حقناً عن طريق الوريد، وهو فعّال ضد البكتيريا إيجابية الغرام، وخاصة *المكورة المعوية Enterococcus faecium* المقاومة للفانكومايسين (Vancomycin)، *والعنقودية الذهبية Staphylococcus aureus* المقاومة للميثيسيلين (Methicillin). وقد سُجّل أن هناك مقاومة ضد الستريبتوغرامينات هذه، ويبدو أنها تتفاقم بسبب استخدام الفيرجينمايسين (Virginaycine) في علف الحيوانات.



11.2.18 الببيتيدات الدهنية الجديدة New Lipopeptides

دابتومايسين (daptomycin) هو أحد مضادات الحيوية التابعة لمجموعة الببيتيدات الدهنية التي رخص استخدامها حديثاً في علاج إصابات الجلد المعقدة وإصابات بنية الجلد الناجمة عن سلالات حساسة لهذا المضاد والتي تضم *العنقودية*

الذهبية *Staphylococcus aureus* (بما فيها السلالات المقاومة للميثيسيلين methicillin) *والعِقْدِيَّةُ المُقَيِّحَة* *Steptococcus pyogenes* وسلالات *المكورة المعوية* *Enterococcus faecalis* الحساسة للفانكومايسين (Vancomycin). يعطى هذا المضاد الحيوي حقناً عن طريق الوريد. إن أفراد هذا الصنف من مضادات الحيوية التابعة للبيبتيدات الدهنية هم أمثلة عن مضادات الحيوية التي طُوِّرت كمضادات ضيقة الطيف تستخدم لحالات خاصة، مثلاً ضد الكائنات المقاومة للفانكومايسين والميثيسيلين. لم تدرج هذه مضادات من أجل الاستخدام العلاجي في الأصل، وذلك بسبب طيف فعاليتها المحدود في وقت كانت برامج الغربلة معنية بتعريف مضادات حيوية ذات طيف فعالية واسع ومركبات، يمكن تطويرها كعوامل علاجية تعطى عن طريق الفم. ومع نجاح الدابتومايسين، يجري الآن دراسة أفراد أخرى من صنف من البيبتيدات الدهنية لتحديد إمكانية استخدامها ضد كائنات مقاومة لمضادات الحيوية. وتعود الفعالية الحيوية لهذه مضادات الحيوية أساساً إلى إحداث خلل بأوجه متعددة من وظائف الغشاء البكتيري. تتألف بنية هذه مضادات الحيوية من نواة بيبتيد حلقي شائع يرتبط عند النهاية الأمينية بسلاسل أسيل دهنية متنوعة.

12.2.18 الباسيتراسين ومضادات حيوية ببتيدية أخرى

Bacitracin and other peptide antibiotics

ينتمي البكيتراسين والتيروسيدينات Tyrocidins لصنف آخر من مضادات الحيوية ذات البيبتيد الحلقي الصغير التي تستخدم بشكل رئيسي كمضادات جرثومية موضعية في علاج الإنسان. ينقص هذه الجزيئات سلسلة الدهن الجانبية التي توجد في الببتيدات الدهنية ممثلة بالدبتومايسين الموصوف أعلاه. وقد اكتشفت هذه المجموعة في مرحلة مبكرة من البحث عن مضادات حيوية وهي جميعها غير مغطاة ببراءة اختراع وتباع بدون وصفة طبية، إما كمركبات منفردة أو مُدمَجة مع بعضها البعض. تصنع هذه مضادات من خلال آلية تصنيع لا ريبوزومية بواسطة بكتيريا من نوع *Bacillus*. وهي تمتلك مواصفات أمان وحركية دوائية سيئة في

حال أخذها عن طريق الفم، ولكنها تستمر في حيازة نطاق علاجي هام كونها قاتلة للبكتيريا، إذ إن الدليل ضئيل جداً على نشوء مقاومة بكتيرية لها، بالرغم من استخدامها الواسع وغير المضبوط .

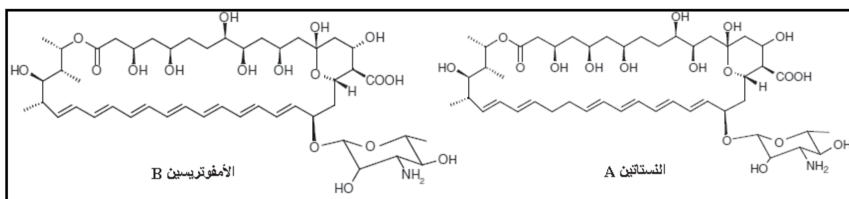
13.2.18 البكتريوسينات Bacteriocins

بالرغم من أن مضادات الجراثيم هذه ليست مصنفة كمضادات حيوية لاستخدام البشري إلا أنها مصنفة كإضافات غذائية تُستخدم لحفظ الأغذية. تستحق البيتراسينات أن تُذكر بأنها مجموعة صغيرة، لكنها مهمة صناعياً، من المركبات التي تُنتَج جرثومياً وتمتلك فعالية متأصلة مضادة للجراثيم. ومَثَلُ هذا الصنف هو النيسين Nisin. وهو بيبتيد/بروتين صغير يُنتَج ريبوزومياً، ويضم تعديلات ما بعد الترجمة، ممّا يتيح المجال لإدخال أحماض أمينية غير اعتيادية (اللانثيوننينات Lanthionines) عليه. وبذلك فهو يختلف عن البنيسيلينات/ والسيفالوسبورينات وعن صنف البكتيريوسن/التيروسيدين tyrocidin من مضادات الحيوية التي تنتج بواسطة معقدات أنزيمية لا ريبوزومية. يستخدم النيسين بشكل واسع من أجل حفظ الأجبان، والقشدة المتخثرة وبعض الخضار المعلَّبة. وهو يصنف في الولايات المتحدة والاتحاد الأوروبي واليابان على أنه مادة مُعْتَرَف بأمانها بشكل عام (Generally Recognised as Safe-GRAS) .

14.2.18 البوليينات Polyenes

هناك مجموعة أخرى من مضادات عديدات الكتايد (Polyketide) الحيوية وهي البوليينات الكبيرة، وهي تستخدم بشكل رئيسي كعلاج مضاد للفطريات بدلاً من استخدامها كمضادات للبكتيريا. فهي تُمَزِّق أغشية الستيرول Sterol عند الفطريات وتقتل الكائن الحي. ومثال هذا الصنف هو الأمفوتريسين B (Amphotericin B) والنيستاتين (Nystatin). وكلاهما سام جداً، لكن الأمفوتريسين B غالباً ما يستخدم كخيار أخير عندما يفشل العلاج بعوامل مثبطة لنمو الفطور، مثل الآزولات Azoles ويجب أن يعطى الأمفوتريسين B عن طريق الوريدن فهوضعيف الانحلال. كما استخدمت أشكال غروية وكريات دهنية

(ليبوسومية Liposomes) من أجل إحراز مستويات تعرض قصوى. وبشكل عام، فإن الأمفوتريسين B يمتلك طيف فعالية واسع وهو فعّال ضد معظم الفطور الممرضة.



15.2.18 الغريسيوفولفين
Griseofulvin

الغريسيوفولفين هو مضاد فطري استُخرج لأول مرة من فطر يتبع لنوع *Penicillium* في العام 1939. وهو مركب لا ينحل في الماء، فعّال لدى إعطائه عن طريق الفم. ويترسب بشكل رئيسي في خلايا مركبات الكيراتين (Keratin) السالفة، فهو فعّال بشكل رئيسي على الفطور الجلدية Dermatophytes . يؤثر هذا المضاد الفطري عن طريق التدخل في البنية الأنبيبية (Microtubular structures) لانقسام الخلية بحيث لا تتمكن الخلايا الفطرية من التكاثر. بعد ذلك، يتم التخلص من الإصابة بواسطة الجهاز المناعي للعائل. لقد كان الغريسيوفولفين دواء الخط الدفاعي الأول في علاج أمراض الجلد الفطرية لعدد من السنوات، من دون حدوث آثار عكسية كثيرة. ولكن بعد نشوء بدائل له مثل الإتراكونازول (Itraconazole) والتيربينافين (Terbinafine)، فإن استخدامه بات محدوداً.

16.2.18 العاثيَّات البكتيرية Bacteriophages

رغم أن استخدامها ليس شائعاً، إلا أن هذا الصنف كان قد استخدم لعلاج الإنسان، خاصة في الاتحاد السوفييتي السابق. وإن هذا المفهوم (أي المفهوم العلاجي للعاثيات) يجذب الانتباه الآن باعتباره طريقة لعلاج السلالات المقاومة من البكتيريا. هذه الفيروسات شديدة التخصص بأنواع محددة وسلالات دقيقة من البكتيريا، ولكنها بشكلٍ عام حميدة للعائل البشري أثناء إصابتها البكتيريا. وهي تتكاثر في خلايا

البكتيريا المضيفة وتؤدي في النهاية إلى قتلها عن طريق تحللها. وفي حين أنها تنتج بواسطة تكنولوجيا التخمير كما في إنتاج مضادات الحيوية، إلا أن استخدامها علاجياً يمثل تحدٍّ. إن العاثيات شديدة التخصص حتى مستوى تحت السلالة البكتيرية، لذلك هناك مقتضيان اثنان يجب انعقادهما حتى تكون هذه العاثيات ناجعة علاجياً: أولاً، من الضروري توفر آليات تشخيصية جيدة وسريعة من أجل تحديد السلالات البكتيرية؛ وثانياً، يجب أن يكون الفيروس العاثي لتلك السلالة متوفراً على الفور. وتوفر هذين الشرطين يمثل تحدياً أكبر من توفر مضادات الحيوية واسعة الطيف. أما التأثيرات الجانبية لاستخدامها فهي الأدنى، حيث تتعرض هذه الفيروسات للبلعمة (أي تزال من خلال بلعمتها وتحطيمها من قبل الكريات البيضاء) داخل العائل. لذلك يكون التخلص منها في الجسم سريعاً. من الممكن أن يكون هناك بعض الاستجابة المناعية من قبل العائل، لذلك فإن إعادة استخدامها قد يكون مشكلة، لكن هذه الفيروسات تبدو بأنها غير سامة للإنسان. وقد استخدمت موضعياً في حالات تعفن الدم الناتجة عن الحروق، ويبدو أن الاستخدام المرجو أكثر لها هو في مجال الزراعة، حيث يمكنها أن تستبدل مضادات الحيوية التي تستخدم كمعززات للنمو. يقدم هذا الصنف تحدياً لعلماء التقانة الحيوية الصناعية من حيث إيجاد أفضل طريقة لإنتاج نطاقٍ واسعٍ منها جاهز للاستخدام العلاجي ونموذجٍ قابلٍ للتطبيق اقتصادياً.

3.18 تحسين السلالة Strain improvement

هناك ثلاثة تطبيقات أساسية لتقانة الهندسة الوراثية في إنتاج مضادات الحيوية:

- برامج تحسين السلالة؛
- إدخال جينات لإنتاج مضادات حيوية جديدة وغير مألوفة؛
- وهندسة سلالات جرثومية وأنزيمات مستخدمة في العملية الإنتاجية.

تتيح وفرة المعرفة المتزايدة في مجال مسارات التصنيع الحيوي أن يكون هناك مقاربة أكثر عقلانية في التلاعب الجيني للكائنات المنتجة، كما أنها تطرح مقاربة جديدة لدمج مسارات التصنيع الحيوي من كائنات مختلفة إما من أجل أمثلة العملية الإنتاجية لمضادات حيوية معروفة إلى أبعد قدرٍ ممكن أو لاقتراح بناء

جزيئات مهجنة ذات مواصفات من المحتمل أن تكون محسنة أو جديدة. إضافة إلى ذلك، ما زال هناك أمل في إمكانية استبدال التلاعبات الكيميائية التي تجرى على بنية الجزيئات الأساسية لإنتاج المركبات المرغوبة.

1.3.18 تحسين السلالة التقليدي Conventional strain improvement

إن برامج تحسين السلالات هي إما ذات طبيعة تجريبية (ما في السابق)، أي عن طريق إحداث طفرات وانتقاء الكائنات ذات الإنتاج المحسَّن لمضادات الحيوية، أو أنها موجهة بواسطة المعرفة بالمسارات المستخدمة في التمثيل الحيوي للعملية الإنتاجية كما هي مؤخراً. وتتضمن برامج تحسين السلالة التحديات التالية:

- العمل لتحسين الإنتاج لدى سلالات تمت هندستها والتي وصلت تقريباً إلى حد طاقتها في التصنيع الحيوي؛
- الإبقاء على مستويات الإنتاج هذه في بيئة إنتاجية صناعية حيث ما يتكرر فيها ارتداد للإنتاج إلى مستويات منخفضة؛
- تكييف الإنتاج مع مصادر أرخص للمواد الأولية.

في هذه البرامج، يتم تعريض أبواغ الكئنات المنتجة، لعوامل تطفيرية متنوعة كتلك المدرجة في الجدول 1.18، إما بشكل منفرد أو مجتمعة.

بعد هذه المعالجة، يتاح للأبواغ أن تفرخ مستعمرات منفردة. بعد ذلك تُفحص مقدرتها على إنتاج مضادات الحيوية، ويتم اختيارها على هذا الأساس وعلى أساس معايير أخرى، كانخفاض تشكيل الصباغ.

الجدول 1.18:	**عوامل التطفير الشائعة**
العوامل الفيزيائية	الأشعة فوق البنفسجية الاشعة السينية أشعة غاما
العوامل الكيميائية	الخردل الآزوتي N–ميثيل–N’–نيترو–N–نيتروزو غوانيدين N-methyl-N’-nitro-N-nitroso guanidine

إضافة لذلك تختبر مقدرة العزلات (التي تضم مستعمرات معزولة تم اختيارها وفقاً للمواصات المطلوبة) على النمو وإنتاج الأبواغ. ويتم التخلص من تلك التي تبدي مواصفات متدنية. وتتطلب هذه العملية اختبار عدد كبير من العزلات الفردية (التي تضم كلاً منها مستعمرة معزولة تم اختيارها وفقاً للمواصفات المطلوبة) كما تتطلب تطوير طرائق غربلة وتحليل مناسبة تتيح الحكم بشكل قوي على السلالات المختارة من أجل متابعة اختبارها على نطاق أكبر وباستخدام مكونات الأوساط المستخدمة في عملية الإنتاج (انظر الفصل الثاني عشر). أيضاً، من الممكن إحداث مواصفات مرغوبة عن طريق التهجين الراجع لسلالات مختلفة ومن ثم إعادة عملية الاختيار. تشمل بعض مواصفات السلالات المحسنة التي تم اختيارها عن طريق برامج تحسين السلالة:

- مزارع تنمو على شكل حبيبات بدلاً من خيوط.
- مزارع فقدت الأصبغة.
- والتخلص من المنتجات الثانوية.

2.3.18 الهندسة الوراثية Genetic engineering

لقد تم الأخذ بمقاربة منطقية أكثر في التلاعب بالسلالات المنتجة لمضادات الحيوية وذلك من خلال سلسلة جينوم الجراثيم المنتجة لها، أو على الأقل سلسلة عناقيد (تجمع) الجينات المسؤولة عن التصنيع الحيوي لمضادات الحيوية. ومع اكتشاف أن الكثير من جينات التصنيع الحيوي لعلئلات مختلفة من مضادات الحيوية تتجمع على صبغيات (كروموسومات) الكائنات المنتجة لها، وأنها تُنظم سوية، فقد بات واضحاً أن التلاعب بهذه الجينات بشكل منهجي قد يقود إلى تحسين الإنتاج بالإضافة إلى إنتاج مضادات حيوية جديدة. وينطبق هذا بوضوح على مجموعات جينات عديدات الكتايد المسؤولة عن إنتاج مضادات الماكرولايدات. من الممكن التلاعب بعمليات الأكسدة (Oxidation) ونزع الماء (Dehydration) التي تتم تدريجياً أثناء عملية التصنيع الحيوي لهذه الجزيئات، وذلك من خلال حذف الجينات أو إضافتها بشكل ملائم إلى كاسيتات التصنيع الحيوي. ويعمل عدد من الشركات بنشاط لتحقيق الهدف في إنتاج مضادات حيوية جديدة أو جزيئات

أساسية، بحيث يمكن من خلال التلاعب شبه التصنيعي فيها الوصول إلى بنيتها النهائية. بالإضافة إلى ذلك، لقد أظهر التحليل الجيني للسلالات الأعلى إنتاجاً من البنيسيلين والسيفالوسبورينات بأن جزءاً من الزيادة في الإنتاجية يمكن تفسيره بمضاعفة تجمع الجينات على نفس الصبغي أو على صبغيات أخرى لدى السلالات ذات الإنتاجية المنخفضة أصلاً.

إن ابتكار مضادات حيوية مهجنة عن طريق إدخال جينات من كائنات مختلفة هو حيز تحدٍّ للاستثمار في المستقبل. والأمثلة المنشورة عن سلسلة مضادات الأنثراسايكلين (Anthracycline) الحيوية قليلة وبسيطة ، في حين أن التحدي أكبر بكثير وذلك لوجود صفة الانتقائية للمركب الأولي لدى أنزيمات التصنيع الحيوي التي يصعب تغييرها. تُعتبر هندسة سلالة جرثومية قادرة بشكل مباشر على تصنيع السيفالوسبورين، الكأس المقدس منذ زمن، بحيث أن هذا السيفاوسبورين يمكن استخلاصه بالمذيبات العضوية، كالسيفالويبورين V أو G عن طريق إضافة أحماض خل عطرية، مثل حمض الخل الفينيلي Phenyl acetic acid أو حمض الخل الفينوكسي (Phenoxy acetic acid) إلى نواة السيفالوسبورين باستخدام الأنزيمات المدمجة التي تدخل في مسار التصنيع الحيوي للبنيسيلين V والسيفالوسبورين C . إلا أنه وبالرغم من الجهد الجدير بالاعتبار، فإن ذلك لم يُنجز بعد، والتحدي الآخر الذي لا بد من مواجهته هو التوصل إلى بديل عن إدخال أنزيم الإكسبانداز (Expendase) المأخوذ من فطر تابع لجنس *رأسيات الأبواغ Cephalosporium* إلى داخل فطر البنيسيليوم، مما سيقود أيضاً إلى الإنتاج المباشر لسيفالوسبورينات قابلة للاستخلاص بالمذيبات العضوية.

4.18 عمليات الإنتاج Production process

يضم الإنتاج الصناعي لمضادات الحيوية العديد من العمليات، وقد تحولت كل عملية منها كانت معتمدة منذ وقت مبكر للإنتاج في الأربعينيات والخمسينيات من القرن الماضي إلى عمليات تصنيع مضبوطة بالحاسوب وفعالة، تستخدم في أيامنا هذه. وقد نتج هذا التوجه عن الطلب المتواصل لزيادة العطاء من هذه مضادات وتخفيض كلف الإنتاج. تتألف عملية الإنتاج من عدد من الخطوات، وهي:

- حفظ المزرعة والتحضير لزيادة الإنتاج؛
- زيادة كمية الملقِّحات للإنتاج؛
- لتخمير الإنتاجي،
- واسترجاع المنتج وخطوات المعالجة اللاحقة

بالإضافة إلى، خطوات من خارج عملية التصنيع وهي:

- عمليات التلاعب بالسلالات المنتجة اللازمة لاستمرار توالد سلالات جديدة ذات مواصفات مرغوبة،
- تحسينات في المواصفات الفيزيائية لعلمية التخمير،
- والعمل على سلالات بإمكانها استخدام مواد مواد أولية منخفضة الكلفة.

وسيتم في الفقرات التالية التطرق إلى كل هذه الجوانب بغية توضيح أن عمليات التقانة الحيوية الحديثة المستخدمة في إنتاج مضادات الحيوية قد أصبحت أكثر تعقيداً وتطوراً.

5.18 عملية التخمير Fermentation process

يمكن استخدام عملية إنتاج البينيسيلين كمثال على سير عملية الإنتاج الصناعي الواسعة النطاق لمضادات الحيوية، وأيضاً كمثالٍ على بعض التغييرات التي طرأت على هذه العملية خلال السنوات الثلاثين المنصرمة. تضمن إنتاج البينيسيلين بالشكل النموذجي في الخمسينيات من القرن الماضي عملية إنتاج متقطعة (على خطوات، غير مستمرة)، ليسس فقط من حيث عملية التخمير، وإنما أيضاً من حيث تعقيم الأوساط التي كانت تتم في موضعها الأصلي *(in situ)* داخل المحمر. لقد كانت أوساط الزرع مكوّنة من اللاكتوز (Lactose)، وكان زمن دورة الإنتاج 120 ساعة، كما استُخدم أدنى مستوى في ضبط عملية الإنتاج. أما شكل الكائنات المستخدمة فكانت ذات شكل خيطي، بحيث تُزال الميسيليوم (Myclium) على دفعات عن طريق الفلترة، ثم يليها العديد من خطوات الاستخلاص. إضافةإلى ذلك، كان حجم أحواض التخمير 50–100 متر مكعب (m^3)، تراكيز المنتج 0.5–1.0 غرام لكل ليتر($g\ l^{-1}$)، وفعالية العملية 70–80%، وكلفة الإنتاج 275–350 دولاراً أمريكياً لكل كيلوغرام (kg^{-1}).

وعلى العكس من ذلك، إن عمليات التخمير الحديثة هي عمليات عالية الفعالية. يتم فيها إدخال مصادر كربونية أرخص وأكثر توفراً كمزيج الغلوكوز/السكروز وذلك بشكلٍ مستمر وبطريقة مضبوطة، أولاً من أجل تحفيز النمو ثم من أجل الإبقاء على أطوار الإنتاج القصوى. تعقَّم أوساط النمو باستمرار وتكون وضعية التشغيل فيها شبه متواصلة، بحيث يُسحب جزء من مرق الزرع وتتم معالجته على نحوٍ متواصل. كما يجري ضبط متغيرات عملية التخمير كالرقم الهيدروجيني pH والتهوئة عن طريق الحاسوب. هنا يكون النمو على شكل حبيبات، وتبنى عملية المعالجة التالية للتخمير على استرجاع كامل مرق النمو (لا يوجد أي إزالة للكتلة الحيوية) وعلى عمليات استخلاص مستمرة، مع استرجاع محاليل الاستخلاص والمركبات السالفة بعد عملية التجزئة. أما أحجام أحواض التخمير فهي أكبر (100−200 متر مكعب (m^3)) من تلك المستخدم قديماً، وتراكيز المنتج تصل حالياً إلى أكثر من 40 غراماً لكل ليتر (g l^{-1}). كما تزيد فعالية الإنتاج عن 90%. وقد أنقصت هذه العوامل مجتمعة كلفة الإنتاج إلى 15−20 دولاراً أمريكياً لكل كيلوغرام (kg^{-1}). قد نُفذت تحسينات مشابهة على عمليات تخمير مضادات حيوية أخرى، ترافقت مع تحسينات في مستوى الإنتاج وخفض كلفة كميات كبيرة من مضادات الحيوية وكلفة تحويل المركبات السالفة إلى مشتقات شبه تصنيعية.

1.5.18 وسط النمو Growth medium

تصمم الأوساط المخصصة لزيادة الكتلة الخلوية للجراثيم بحيث تؤمن نمواً سريعاً في وضعية الإنتاج المتقطعة مع أقل قدر ممكن من التغيير في الرقم الهيدروجيني pH. لا يجب أن تشكل مكونات وسط النمو المنفردة أكثر من 3−5% من حجمه وهي تؤمن كربوهيدرات سهلة التوفر مثل الغلوكوز والسكروز، كما توفر شكلاً قابلاً للانحلال من الآزوت مثل شراب الذرة الكحولي الحاد أو مستخلص الخميرة. ويمكن إضافة كربونات أو فوسفات الكالسيوم إذا نشأت الحاجة لتثبيت الرقم الهيدروجيني (Buffering)، وغالباً ما تكون هذه هي الحالة وذلك بسبب الأحماض العضوية التي يمكن أن تنتج عن الأيض السريع للسكريات. كما يمكن استخدام كبريتات الأمونيوم لتأمين كميات إضافية من الآزوت.

2.5.18 أوساط الإنتاج Production media

هذه الأوساط مغطاة بحقوق ملكية وتم تطويرها وضبطها بشكلٍ دقيق عبر السنين. وهي دائماً تمثل تسوية بين الكلفة والأداء. إن أكثر الأوساط ملاءمة هي تلك التي تستخدم مواد أولية رخيصة ضمن توليفات ويمكن أن تقود إلى أقصى إنتاجية. تكون عمليات التخمير الخاصة بمرحلة الإنتاج على شكل دفعات، مما تهييء الفرصة لأمثلة التخمير بحيث تؤمن التوازن الدقيق بين نمو الخلايا المضبوط وأعلى قدر من التصنيع الحيوي. أما المواد الأولية التي ستسستخدم في مرحلة الدفعة الابتدائية (الأولى) فيجب أن تؤمن كلاً من المغذيات المذابة التي يمكن للخلايا استخدامها فوراً، والمغذيات التي تبقى لفترة أطول وهي مصادر أقل ذوبان. ومصادر الكربون الابتدائية هي الأقل تأزيماً لنجاح العملية وذلك لسهولة إضافتها في صورة منحلة خلال عملية التخمير. وتُستخرج مصادر الآزوت المناسبة من أصول زراعية، ولكن يمكن أن تنشأ عن ذلك تساؤلات تتعلق بنوعية هذه المصادر وتبايُنها ضمن فصول السنة وبين فصل وآخر. لذلك يمثل هذا مصدر قلق مستمر مرتبط بالمحافظة على عمليات تخمير متناتجة (Reproducible) (يمكن تنفيذها مراراً بنفس الشروط والناتج). ومن أجل التخفيف من هذه الحالة يمكن استخدام العديد من المواد الأولية الأخرى لمنع حدوث تباينات كبيرة.

لا يوجد في بعض عمليات التخمير عالية الإنتاجية الحديثة فصل واضح بين المراحل الأساسية (تفاعلات متعددة الأطوار (Tropophasic) وتلك الثانوية (تفاعلات أحادية الطور (Idiophasic)، ومن أجل الحصول على معدلات إنتاج قصوى. يجري تخليق الشروط التي يمكن أن تؤمن إنتاج مبكر وسريع للصادات مع استمرار نمو الخلايا، وهذه هي هي الشروط الأكثر شيوعاً الموظفة في مصانع إنتاج الصادات. المواد الأولية المضافة قابلة للانحلال وتستخدم بسرعة. الكربوهيدرات المناسبة هي السكروز، والغلوكوز أو عصير الذرة المهدرج أنزيمياً. يمكن استخدام مصادر كربون أخرى. وإذا كان هناك ضرورة يمكن استكمالها بنيتروجين قابل للانحلال مأخوذ من السائل الناتج من تخمير الذرة. ومن شأن للمواظبة في التغذية بالكربوهيدرات الجاهزة

للاستخدام كالغلوكوز أن تمنع كبح عمليات التقويض (الاستقلاب) حيث سيكون تركيز السكر منخفضاً جداً بشكل دائم.

3.5.18 ضبط تشكل الرغوة (الثمالة) Foam control

إن استقلاب المغذيات البروتينية الموجودة في المواد الأولية المعقدة يخلق رغوة بشكل مستمر، لذلك من الضروري ضبط مستوى تشكل الرغوة على سطح مرق التخمير. وتستخدم الزيوت، مثل التراي أسيل غليسيرول، زيت الشحم الحيواني أو زيت الصويا، أو زيت الفول السوداني، أو زيت لفت الشلجم بشكل شائع كمواد مضادة للرغوة، وما يحدد الخيار بين هذه المواد هو توفر أياً منها محلياً. وتمتلك هذه تأثيراً مكملاً يتجلى في قيامها بدور مصدر بديل للكربون يحفز تشكل المنتج. تستعمل أيضاً المنتجات التي يشكل أساسها السيليكون أو البولي بروبيلين غليكول كعوامل مضادة لتشكل الرغوة مكملة أو بديلة للزيت. وبما أن تشكل الرغوة غالباً ما يحصل في أوقات غير متوقعة، فمن الأهمية بمكان توفر نظام تغذية راجعة لإضافة فعّالة للمواد المضادة للرغوة، تؤم ضبطاً كافياً لإنتاج الرغوة بدون الاستخدام المفرط لهذه المواد. يجب أن تتوفر مضادات الرغوة عند الحاجة فقط، ولا يجب إضافتها من البداية مع وسط عملية التخمير وذلك بسبب الطبيعة السامة لبعض مضادات الرغوة، بالإضافة إلى النقص في كمية الهواء المتوفرة الناجم عن وجود مستويات زائدة من مضادات الرغوة (انظر الفصل الثامن). كذلك يمكن أن يتسبب الاستخدام الزائد لمضادات الرغوة في صعوبات معالجة استرجاع المنتج التي تلي عملية التخمير.

4.5.18 التغذية على دفعات Fed-batch feeding

يمكن أن يتنوع حجم المغذيات القابلة للانحلال تبعاً لتركيزها (وهو عادة بين 30–65%). وقد يكون من الضروري القيام بحصاد مبكر للإنتاج عندما يكون تركيز السكر أخفض وذلك من أجل تخفيض الازدياد الحاصل في حجم المرق تالناجم عن إضافة حجم كبير من المواد المغذية. إن إضافة المحاليل الممدة له ميزة إضافية وهي تخفيض لزوجة المرق، وهي عادة ما تشكل مشكلة في حالة المزارع الخيطية. ينتج

الحصاد الجزئي المبكر أحجاماً كبيرة من الصادات الممدة فيما يخص استرجاع المنتج. ولكن، بالمعالجة الصحيحة يمكن لهذه الطرائق (البروتوكولات) أن تكون عالية الإنتاجية حيث يمكن المحافظة على معدل الإنتاج الأعظمي لعملية التخمير لفترات طويلة. يمكن ضبط الرقم الهيدروجيني للمرق ضمن حدود 0.1 وحدة عن طريق إضافة حمض (حمض الكبريت) أو قلوي (يضاف غاز الصودا الكاوية أو الأمونيا عن طريق مدخل الهواء). يمكن ضبط الرقم الهيدروجيني أيضاً باستخدام أيض المزرعة نفسها للسكريات الموجودة فيها. إن الإضافة الزائدة للسكر ضمن بعض الشروط سينتج حمض الخل، وهذا سيخفض الرقم الهيدروجيني. على العكس من ذلك، يمكن أن يؤدي تخفيض معدلات إضافة السكر إلى رفع الرقم الهيدروجيني.

6.5.18 الأكسجين المذاب (DO) Dissolved oxygen

تشكل مستويات الأكسجين المذاب DO شرطاً محدداً للإبقاء على حدٍ أعظمي لإنتاج الصادات الحيوية وللمحافظة على حيوية المزرعة. وبما أن استخدام أكسجين نقي أمر بالغ الكلفة، بالإضافة إلى كونه يشكل مصدر قلق على أمان العملية، يستخدم هواء الجو المحيط كمصدر للأكسجين. يجب تأسيس توازن دقيق بين التهوية والتحريك الضروري لتوزيع الأكسجين في الطور السائل. الضغط الراجع داخل الحوض لزيادة ذوبان الأكسجين، تمدد حجم مرق التخمير، وتأثير وتضافر العديد من هذه التأثيرات على مستويات ثاني أكسيد الكربون المذاب (انظر الفصل الثامن). يجب الإبقاء على مستويات الأكسجين المذاب أعلى من 20% من درجة الإشباع عند 1.5–2 ضغط جوي. يجب الإبقاء على الضغط على مدى عملية التخمير والإبقاء على معدلات تدفق الهواء عند قيم عالية بما يكفي لإزالة أكبر قدر ممكن من ثاني أكسيد الكربون. إذ إن تراكم ثاني أكسيد الكربون قد يكون له تأثير سلبي في الكائنات الدقيقة.

7.5.18 حفظ المزرعة وإكثارها في جو مُطهر
Culture preservation and aseptic propogation

يجب الانتباه إلى الأسلوب الصحيح لحفظ المزارع الجرثومية عالية الإنتاج والأسلوب الصحيح لإكثارها. إن ثبات المزارع الجرثومية الحديثة ذات التاريخ

الطويل من الطفرات، والعدد الزائد من نسخ بعض الجينات فيها واحتمال احتوائها على جينات مأشوبة أمر غير مضمون. قد ينتج النقل المتكرر من وسط إلى وسط للسلالات عالية الإنتاج في مجتمعات (Sub-population) منخفضة الإنتاج من هذه السلالات ذات مظهر أقرب إلى الشكل الطبيعي (البري) لها. وأكثر الطرائق ملاءمة لحفظ المزارع الجرثومية لفترات طويلة هي باستخدام النيتروجين السائل. وعادة ما يتم الحفاظ على المزارع الأساسية من خلال تراتبية (هرمية) في بنك خلوي رئيسي، حيث تستخدم كل مزرعة رئيسية مجمدة، من الأصل المُشكِل للعديد من هذه المزارع، من أجل تشكيل عدد كبير من الزرعات الأصلية التي ستستخدم في الإنتاج. بهذه الطريقة، سيكون هنالك دائماً ذرية (سلالة) مشتركة يمكن منها البدء بإكثار الخلايا.

يتم تحضير خط خلوي رئيسي جديد من خلال إعادة عزل خلية مفردة أو بوغة، ويجري تقويم قاسٍ لكل دفعة بواسطة التخمير في دوارق هزازة وفي وحدات تصنيع تجريبية للتأكد من تفوقها وثباتيتها قبل استخدام المزرعة في عمليات تصنيع على نطاق واسع. ويتبع حرص شديد للإبقاء على شروط التعقيم أثناء عملية زيادة حجوم المزرعة. وهذا جوهري بشكل خاص في مرحلة البَذر حيث تكون المزارع في حالة نمو سريع، وحيث تتم عمليات النقل المقررة إلى الخزان قبل إدراك الحالة الكاملة من التعقيم

8.5.18 الزيادة المتناسبة Scaling-up

بغية تقويم أداء سلالة جديدة، يتم اختيار أوساط خاصة بدوارق الزرع وشروط تؤمن بيئات أقرب ما تكون إلى عمليات التخمير التي تتم في خزانات تخمير كبيرة الحجم مزودة بخلاطات. وهذا غير ممكن دائماً ويجب القيام بكثير من التسويات. ولا يمكن تأسيس علاقة جيدة بين أداء دوارق الزرع، والوحدات الصناعية التجريبية والتخمير على نطاق كبير إلا بعد سنوات من المقارنة الحريصة. ليس من الصعب فقط تقدير إمكانية زيادة محتملة قيمتها 5% أو أقل في تجارب على نطاق دوارق الزرع، ولكن ذلك يصعب تقديره أيضاً على نطاق الوحدات الصناعية التجريبية حيث تكون المصادر محدودة وعمليات التقويم ذات

كلفة عالية. من المرغوب دائماً توفر مزارع جديدة تتلاءم بسهولة مع أنظمة التخمير الموجودة بدون الحاجة إلى أي عمل تطويري إضافي. مع ذلك، فإن المزارع الجديدة غالباً ما تمتلك مواصفات بحاجة إلى المزيد من التطوير لتعبر عن إمكاناتها بالشكل الكامل. ويمكن، هنا، لتضافر المهارات من اختصاصات مختلفة من المهندسين الحيويين، وعلماء الجراثيم، والكيمياء الحيويين أن يثبت مردوديته

ومن أجل التحقيق الفعلي للزيادة المتناسبة في ذرية المزرعة الرئيسية البدئية بدءاً من دوارق النمو وصولاً إلى خزانات الإنتاج، يجري توسيع مزرعة الخزينة الأساس عبر سلسلة من الأواني الأصغر، وهذا يمكن من ازيادرة سريعة في كتلة المزرعة، عادة خلال 1−3 أيام من عملية التخمير، حتى يتم الحصول على كتلة خلوية تمكن من تلقيح المخمر الإنتاج بما يعادل 5−10% من حجم المخمر.

6.18 معالجات الاسترجاع وما بعد الاسترجاع

Recovery and post-recovery processing

يعرض الفصل التاسع مراجعة شاملة لإجراءات الاسترجاع وما بعد الاسترجاع الممكنة . وفيما يتعلق بالصادات الحيوية التي تم التعرض لها أعلاه، هناك حاجة إلى تعديل عمليات الاسترجاع التي تلي الإنتاج بحيث تناسب كل مركب بالتحديد. مثلاً، الأمينوغليكوسيدات هي مركبات شديدة القطبية وعمليات الاستخلاص بالمذيبات ليست خياراً مناسباً لهذه الجزيئات، وتستخدم المبادلات الشاردية كبديل عن ذلك. ولكن الاسترجاع بواسطة المحاليل هو الخيار المفضل لمركبات مثل البيسيلين G و V إما أن يتم تحميض كامل المرق ويستخلص الصاد الحيوي بمحاليل عضوية، يليه عملية تنقية وترسيب على شكل ملح الصوديوم أو البوتاسيوم، أو يمكن ترسيب البينيسيلين V مباشرة من الرشاحة الرائقة عند قيمة الرقم الهيدروجيني 2، يليه عملية تنقية. بالإضافة إلى ذلك، توظف العمليات الحديثة التي تستخدم البنيسيلين في صناعة نواة حلقة 6− حمض البينيسيلانيك الأميني 6 Aminopenicillanic acid (6-APA)- استخلاصاً راجعاً من محلول الاستخلاص إلى الطور المائي، وهذا يستخدم باعتباره العصير الأم للعملية الأنزيمية التي تحول البينيسيلين إلى 6-APA .

إن الدافع إلى تحويل البنيسيلين الخام من أجل توليد نواة الوسيط 6 APA- هو الحاجة إلى إنتاج أجيال جديدة ذات طيف موسع من صادات البينيسيلين، وحتى مع هذه الجزيئات، فإن الترسيب المباشر من المرق الرائق هو أحد الخيارات العملية الهندسية المستخدمة. يجب إدراك أن استرجاع الصادات الحوية والمعالجة التي تلي ذلك هي طريقة غالباً ما تنطوي على تكاليف إنتاج مرتفعة مرافقة: تلك المرتبطة مباشرة باسترجاع الصاد الحيوي، بالإضافة إلى تكاليف بيئية مرتبطة بالتقنية المستخدمة. مثلاً، لقد خفض الاسترجاع المحسن للمحاليل والركائز كلفة إنتاج البينيسيلين والسيفالوسبورينات، كما حسن تنشيط إعادة تدوير الراتنجات (Resins) المستخدمة في عمليات استرجاع صادات حيوية أخرى اقتصاديات إنتاج هذه المركبات.

يظهر الشكل 3.18 استرجاع وتنقية البينيسيلين. الخطوة الأساسية هي الاستخلاص بواسطة محلول عضوي. من أجل الحصول على بينيسيلين عالي النقاوة، تستخدم عملية الإستخلاص البودبيلنياك، وهو جهاز استخلاص بالطرد المركزي. ويؤمن هذا زمن استخلاص قصير مع تفكك قليل للبينيسيلين في المحلول العضوي. تستخدم الأعفان في تصنيع البينيسيلين، ويمكن فصل مستعمرات الأعفان (الميسيليوم) بواسطة مرشح دوار تحت التفريغ. يضاف أولاً كلوريد الكالسيوم ومتعدد التكهرل (محلول ناقل للكهرباء) إلى الميسيليوم من أجل تشكيل جسيمات كبيرة (ندف). يستخلص البينيسيلين من الرشاحة إلى محلول عضوي (عادة أسيتات الأميل). ينقل البينيسيلين بعد ذلك من المحلول إلى محلول مائي متعادل الرقم الهيدروجيني. تزيد هذه الخطوات تركيز البينيسيلين حوالى مئة مرة. ومن أجل إزالة الشوائب، يستخدم الكربون المنشطة بعد الإستخلاص. وتزيل عملية ترشيح هذا الكربون ووتهييء البينيسيلين إلى الترسيب على شكل ملح صوديوم أو بوتاسيوم. تحفز عملية الترسيب بواسطة الأسيتونويتبع ذلك الغسيل بالغول (الكحول) لإزالة الشوائب المتبقية. ولأن العملية تتضمن استخدام ثلاثة محاليل، فإن استرجاع هذه المحاليل يحدد اقتصاديتها.

7.18 مستقبل مضادات الحيوية ذات المنشأ التخميري
Future prospects for fermentation – based antibiotics

سيكون هناك حاجة مستمرة إلى تطوير صادات حيوية واسعة الطيف وأخرى ضيقة الطيف. بعضها سيتأتى عن غربلة مركبات كيميائية صنعية وعن مكتبات (Combinatorial) ضد أهداف بكتيرية أو بكتيريا جديدة وذلك من خلال نماذج غربلة تقليدية. ولكن، هناك إمكانية كبيرة لبزوغ عوامل جديدة من خلال غربلة منتجات طبيعية كمصادر لتنوع كيميائي مبتكر (جديد). وسيكون بعض هذه المنتجات معقداً إلى درجة أنه إما أن العامل سيحتاج إلى (1) أن ينتج بطرائق التخمير التقليدية وطرائق التقانات الحيوية ليستخدم كما هو، أو (2) أن يستخدم لإنتاج نواة تحمل الخاصة الدوائية والتي يمكن تعديلها كيميائياً لإنتاج مضاد حيوي هجين، جرياً على ما تم بالنسبة للبينيسيلينات، والسيفالوسبورينات، والأمينوغليكوسيدات.

وبالرغم من أن معظم شركات الدواء تخلت عن البحث عن صادات حيوية وأسقطت برامجها لاكتشاف أدوية طبيعية المنشأ لصالح تطوير جزيئات جديدة صنعية بشكل كامل، فقد اكتشفت شركات التقانة الحيوية الأصغر حجماً بأن غربلة المنتجات الطبيعية يمكن أن تشكل حيزاً يمكن المنافسة من ضمنه ويمكن من تقديم قيمة مضافة.

يتقدم البحث عن مضادات للحيوية من منتجات طبيعية على جبهتين. الأولى هي في إعادة اكتشاف صادات حيوية كان قد تم إسقاطها (1) خلال وضع أولويات لبرامج البحث من قبل شركات الأدوية الأضخم، أو (2) لأسباب تتعلق بالأعمال بحيث إن تقديرات حجم السوق كانت منخفضة جداً لدرجة لا تسمح بالاستمرار في التطوير والحصول على مردرد مناسب لهذا الاستثمار. يمكن أن يكون حجم السوق والعائد مناسباً لشركات ذات حجم أصغر. الجبهة الثانية تتمثل في البحث عن صادات حيوية ذات طيف ضيق، إما إنطلاقاً من بداية جديدة، أو من خلال معطيات تاريخية عن البرامج البحثية التي جرى إسقاطها. وهذه هي الحالة بالنسبة إلى الستربتوغرامينات، التي تملك طيفاً ضيقاً من الفعالية المضادة للجراثيم، ولديها قدرة صغيرة، ولكن مهمة، على اختراق السوق. ولكن، قد يكون هناك مواضيع مبتكرة يحب معالجتها في عملية البحث عن صادات حيوية ضد

الجراثيم الفائقة، تتعلق بضرورة كون هذه الصادات واسعة أو ضيقة الطيف. وبغية تحديد فعالية العوامل الجديدة ضد المتعضيات المقاومة بطريقة فعّالة، قد يصبح من الضروري استخدام هذه المتعضيات عالية المقاومة بشكل مباشر كهدف أساسي في عملية الغربلة. ومن أجل القيام بذلك سيكون من الضروري توظيف إجراءات أمان وأمن بالغة الشدة (مثل مخابر ذات مستوى أمان حيوي P3 وP4): ولن يكون بالإمكان القيام بذلك في بيئة المخابر التقليدية المفتوحة المتوفرة في مخابر الغربلة الصناعية والأكاديمية الموجودة حالياً. وكما أنه هناك عدد قليل من المرافق القادرة على غربلة عوامل كيميائية ضد الفيروس المسبب لنقص المناعة المكتسبة HIV أو ضد المتلازمة التنفسية (الرئوية) الحادة الشديدة SARS، سيكون هناك على الأغلب عدد قليل من المرافق التي يمكن استخدامها في البحث عن عوامل فعّالة ضد هذه السلالات المقاومة بعينها، وغربلتها.

8.18 قراءات إضافية Further reading

Andersson, I., A. C. Terwisscha van Scheltinga, and K. Valegard, "Towards new β-lactam antibiotics," *Cellular and Molecular Life Sciences,* vol. 58 (2001), pp. 1897-1906.

Bhal, V. "Antibiotics," in: M. R. El-Gewely, ed., *Biotechnology Annual Review*, vol. 8 (London: Elsevier Science, 2002), pp. 227-265.

Demain, A. L. and R. P. Elander, "The β-lactam Antibiotics: Past, Present and Future," *Antonie van Leeuwehoek,* vol. 75 (1999), pp. 5-19.

Elander, R. P. "Industrial production of β-lactam Antibiotics," *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 61 (2003), pp. 385-392.

Liu, J., M. Dehbi, and G. Moeck [et al.], "Antimicrobial Drug Discovery through Bacteriophage Genomics," *Nature Biotechnology,* vol. 22 (2004), pp. 185-191.

Ohno, M., Otsuka, M., and M. Yagisawa [et al.], "Antibiotics," in: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A3 (Weinheim: Wiley-VCH, 2004), pp. 341-440.

Service, R. F. "Orphan Drugs of the Future?," *Science,* vol. 303 (2004), p. 1798.

الفصل التاسع عشر

استراتيجيات الزرع

Strategies of Cultivation

سفين-أولوف انفورس
المعهد الملكي للتكنولوجيا، السويد

Sven-Olof Enfors
Royal institute of technology, Sweden

التسمية **Nomenclature**

Cs: تركيز الكربون في المادة الأولية (mol C g^{-1})
(carbon concentration in the substrate)

C_X: تركيز الكربون في الخلايا (mol C g^{-1})
(carbon concentrations in the cells)

C: تركيز الأكسجين المنحل (kg m^{-3})
(dissolved oxygen concentration)

C^* : تركيز الأكسجين المنحل المتوازن مع معدل التخفيف (kg m^{-3})
(dissolved oxygen concentration in equilibrium with the gas phase)

D: معدل التخفيف
(dilution rate) (h^{-1})

D_{crit}: معدل التخفيف الحرج (h^{-1})
(critical dilution rate)

DOT: توتر الأكسجين المنحل (% من إشباع الهواء)
(dissolved oxygen tension)

*DOT: توتر الأكسجين المنحل المتوازن مع الطور الغازي (% من إشباع الهواء) (dissolved oxygen tension in equilibrium with the gas phase)

F: معدل جريان الوسط

(medium flow rate) (m^3h^{-1})

GTR: معدل انتقال الغاز (gas transfer rate) (kg m^{-1} h^{-1})

H: ثابت التحويل (conversion constant) (% 1 g^{-1})

k_d: ثابت معدل الموت النوعي (specific death rate constant) (h^{-1})

K_La: مُعامل انتقال الهواء (oxygen transfer coefficient) (h^{-1})

*K*s: ثابت الإشباع (saturation constant) (kg m^{-3})

N: عدد الخلايا (cell number)

OTR: معدل انتقال الأكسجين (oxygen transfer rate) (kg m^{-3} h^{-1})

P: تركيز المنتج (product concentration)

Q: معدل جريان الهواء (air flow rate) ($m^{-3}h^{-1}$)

q: معدل التفاعل النوعي (specific reaction rate) (kg $kg^{-1}h^{-1}$)

q_O: معدل استهلاك الأكسجين النوعي

(specific oxygen consumption rate) (kg $kg^{-1}h^{-1}$)

q_P: معدل تشكّل المنتج النوعي

(specific product formation rate) (kg $kg^{-1}h^{-1}$)

q_S: معدل الاستهلاك النوعي لمادة أولية مقيِّدة

(kg $kg^{-1}h^{-1}$) (specific consumption rate of limiting substrate)

q_{S2}: معدل الاستهلاك النوعي لمادة أولية غير مقيِّدة

(kg $kg^{-1}h^{-1}$) (specific consumption rate of non-limiting substrate)

q_m: استهلاك المادة الأولية النوعي من أجل البقاء، انظر الشكل 4.19
(specific substrate consumption for maintenance) ($kg\ kg^{-1}h^{-1}$)

$q_{S,an}$: استهلاك المادة الأولية النوعي من أجل عمليات البناء، انظر الشكل 4.19
($kg\ kg^{-1}h^{-1}$)
(specific substrate consumption for anabolism)

$q_{S,en}$: استهلاك المادة الأولية النوعي من أجل أيض الطاقة ، انظر الشكل 4.19
($kg\ kg^{-1}h^{-1}$)
(specific substrate consumption for energy metabolism)

$q_{S,en,growth}$: استهلاك المادة الأولية النوعي في أيض الطاقة المستخدمة في النمو، انظر الشكل 4.19

($kg\ kg^{-1}h^{-1}$)(specific S-consumption in energy metabolism used for growth)

r: معدل التفاعل الحجمي (volumetric reaction rate) ($kg\ m^{-3}h^{-1}$)

S: تركيز المادة الأولية المقيِّدة ($kg\ m^{-3}$)
(limiting substrate concentration)

$S2$: تركيز المادة الأولية غير المقيِّدة ($kg\ m^{-3}$)
(non-limiting substrate concentration)

S_i: تركيز المادة الأولية في مدخل الوسط ($kg\ m^{-3}$)
(substrate concentration in inlet medium (limiting substrate))

$S2_i$: تركيز المادة الأولية غير المقيِّدة في مدخل الوسط ($kg\ m^{-3}$)
(non-limiting substrate concentration in inlet medium)

t: زمن العملية (process time) (h)

V: حجم الوسط (medium volume) (m^3)

X: تركيز الكتلة الحيوية (biomass concentration) ($kg\ m^{-3}$)

X_d: تركيز الخلايا الميتة (concentration of dead cells) ($kg\ m^{-3}$)

X_v: تركيز الخلايا الحية (concentration of viable cells) $(kg\ m^{-3})$

y: تركيز المكوِّن الاعتباطي في المفاعل الحيوي $(kg\ m^{-3})$
(concentration of arbitrary component in the bioreactor)

Y: مُعامل العطاء (yield coefficient) $(kg\ kg^{-1})$

Y_{em}: مُعامل عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية ، باستثناء عطاء البقاء
(yield coefficient of biomass per substrate, exclusive maintenance) $(kg\ kg^{-1})$

$Y_{O/S}$: مُعامل الأكسجين المستهلك لكل مادة أولية مستهلكة $(kg\ kg^{-1})$
(coefficient of oxygen consumed per substrate consumed)

$Y_{P/S}$: مُعامل عطاء المنتج لكل مادة أولية $(kg\ kg^{-1})$
(yield coefficient of product per substrate)

$Y_{X/S}$: مُعامل عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية ، مُتضمّناً عطاء البقاء
$(kg\ kg^{-1})$ (yield coefficient of biomass per substrate, incl. maintenance)

$Y_{X/S2}$: مُعامل العطاء لمادة أولية غير مقيِّدة $(kg\ kg^{-1})$
(yield coefficient for a non-limiting substrate)

δ: عنصر التفريق، معرَّف في الشكل 1.19 (separation factor)

μ: معدل النمو النوعي (specific growth rate) (h^{-1})

الرموز السفلية

g : في الطور الغازي (in gas phase)

i: الجريان في المدخل (inlet)

max: القيمة القصوى (maximum)

o: الجريان في المخرج (outlet)

O،P ،x ،s ، y : عوامل ثابتة تشير إلى مكوِّن غير نوعي، مادة أولية مقيِّدة، كتلة حيوية، أكسجين ومنتج.

1.19 المقدمة Introduction

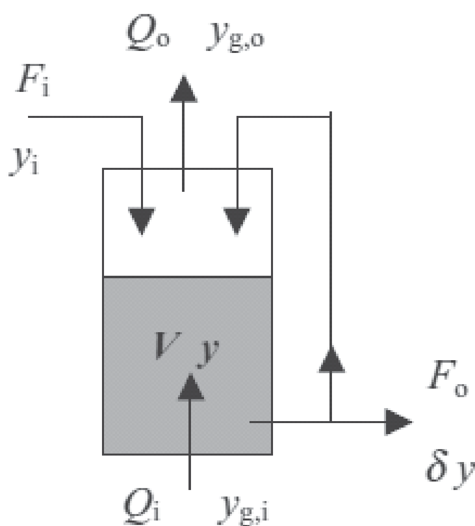
هناك مبدآن أساسيان لعملية زرع الخلايا المعلَّقة وهما: مبدأ *مزارع الدفعة* (*Batch cultures*) ومبدأ *المزارع المستمرة* (*Continuous cultures*). هذه المزارع (أي المستمرة) باستطاعتها، عندما تكون مضبوطة بالشكل الصحيح، أن تحقق حالة الاستقرار، ما يعني أن جميع التركيزات فيها ثابتة مع الزمن. وبذلك، مع وجود احتمال حقيقي للتطفير(Mutation)، فمن المتوقع أن تكون الخلايا مستقرة من حيث التركيبة والوظيفة. أما مزارع الدفعة فتُقسم العمليات فيها إلى عمليات دفعة حقيقية، بحيث ليس من مكوِّنٍ يُضاف خلالها إلا الهواء ومركب تعيير الرقم الهيدروجيني (pH titrating compound)، وإلى عمليات الدفعة المُغذاة (*Fed-batch*) (عمليات التغذية على دفعات)، التي يُضاف أيضاً خلالها محلول مركز بمكوِّن وسط واحد، وعادةً ما يكون هو السكر. هذا الفصل سوف يقوم بوصف الخصائص الأساسية لهذه الأنواع من عمليات الزرع.

2.19 معادلات توازن الكتلة للمفاعل الحيوي

Mass balance equations of the bioreactor

لمحاكاة أداء المفاعل الحيوي، مهما كان نمط التشغيل، نحن بحاجة إلى عبارات جبرية لنُظهر كيفية تأثر تركيز مكونات الوسط المهمة (*متغيرات الحالة* (*State variables*)) بظروف العملية، وبأية طريقة تتبدَّل متغيرات الحالة مع الزمن (t) في عمليات الدفعة، أو مع زمن المكوث (Resident time) في العمليات المستمرة (انظر الفصل السادس). وعلى هذا الأساس، لنُعيِّن أولاً y متغير حالة اعتباطياً. في حين يُشكِّل تركيز الكتلة الحيوية (X)، ومكونات المادة الأولية (S)، والمنتجات (P)، وتوتر الأكسجين المنحل (DOT) متغيِّرات الحالة المهيمن

في المعالجة الحيوية. ثم للوصول إلى الهدف (محاكاة أداء المفاعل الحيوي)، يمكننا اشتقاق معادلات تفاضلية من نوع dy/dt = ...، التي تصف معدل تغير المتغير yمع الزمن. إن تعلق هذا المتغير بالزمن، y(t)، يمكن أن يحاكى بحل رقمي (Numerical solution) للمعادلة التفاضلية، بدءاً بالظروف الأولية (Initial conditions) المعطاة. ففي العمليات المستمرة، هناك حلول تحليلية، يمكن أن تكون مشتقة لوصف كيفية تأثير زمن المكوث (أو معدل التخفيف، D) في متغير الحالة تحت ظروف حالة الاستقرار (Steady-state conditions). الجهاز مبيَّن في الشكل 1.19.



الشكل 1.19: مفاعل مختلط نموذجي مع حجم الوسط V وتركيز y للمكوِّن في المفاعل. معدل جريان الوسط مشار إليه بـ F ومعدل جريان الغاز بـ Q. التراكيز في طور الغاز موسومة بالرمز السفلي g. الرموز السفلية i و o تشير إلى العوامل الثابتة للجريان في المدخل (inlet) وفي المخرج (outlet) على التتالي. عنصر التفريق، δ ($0<\delta<1$)، يُحدد تركيز y في مخرج الوسط.

يمكن أن يكتب توازن الكتلة لمكوِّن اعتباطي بتركيز y في المفاعل الحيوي، كما يلي:

التغير= الداخل – الخارج + التفاعل ($kg\ h^{-1}$)

$$\frac{d(Vy)}{d(t)} = F_i y_i + Q_i y_{gi} - F_o \delta_y - Q_o y_{go} + V_r \quad (1.19)$$

r هو معدل التفاعل الحجمي لإنتاج أو استهلاك المكوّن ذي التركيز y. إعادة ترتيب هذه المعادلة يجعلنا نحصل على *معادلة توازن الكتلة العام* التي تصف تغير y مع الزمن:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{F_i}{V}(y_i - y) + \frac{F_o}{V}(y - \delta_y) + r + GTR \quad (2.19)$$

و يُعبَّر عن معدل تحوُّل الغاز للمكوِّن بـــ :

$$GTR = \frac{Q_i}{V} y_{gi} - \frac{Q_o}{V} Y_{go} \quad (3.19)$$

يُحدَّد نمط تشغيل العملية، أي عملية الدفعة، أو عملية الدفعة المغذاة، أو العملية المستمرة، من قِبل مُشغِّل العملية بوضع قيم F_i و F_o.

في *المزرعة المستمرة*، معدلات الجريان في مخرج الوسط هي $F_i = F_o$ $= F$ والمعادلة (2.19) تصبح:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{F}{V}(y_i - \delta_y) + r + GTR \quad (4.19)$$

في *عملية الدفعة المغذاة* $F_o = 0$، معدل التغذية في المدخل هو $F = F_i$ والمعادلة (2.19) تصبح:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{F}{V}(y_i - y) + r + GTR \quad (5.19)$$

إن توازنات الكتلة لأغلبية المكونات في المفاعل الحيوي لا تضم أي انتقال للغاز، وبذلك يختفي المصطلح الأخير في المعادلات (4.19) و(5.19). لاحظ، عندما لا تطبق إعادة دوران المكونات في المزرعة المستمرة، أي عندما تكون $\delta = 1$، كيف أن معادلتي التوازن العام للكتلة قد أصبحتا متطابقتين في مزرعة الدفعة المغذاة، معادلة (5.19)، والمزرعة المستمرة، معادلة (4.19). إلا أن المعنى الفيزيائي للمصطلح $-F(y/V)$ يختلف في الحالتين. ففي العملية المستمرة (بدون إعادة دوران)، $-F(y/V)$ يمثل معدل الجريان الخارج للمكونات من المفاعل، بينما في عملية الدفعة المغذاة، فإنه يمثل معدل تخفيف المكوِّن الذي يسببه الجريان

الداخل للوسط. الآن، يمكن للمصطلح العام y أن يُستبدل بـــ X، S، P و DOT للتمثيل عن تراكيز الكتلة الحيوية، المادة الأولية، المنتج، والأكسجين المنحل، على التتالي. وقبل تطبيق معادلات توازن الكتلة لدراسة عمليات الدفعة المغذاة والعمليات المستمرة، فإنه يجب إدخال عبارات جبرية لمعدلات التفاعل البيولوجي (r) ومعدل تحوُّل الغاز (GTR) في معادلة توازن الكتلة المقابلة.

3.19 معدلات حجمية ونوعية Volumetric and specific rates

يكتب معدل التفاعل الحجمي، r، بالشكل:

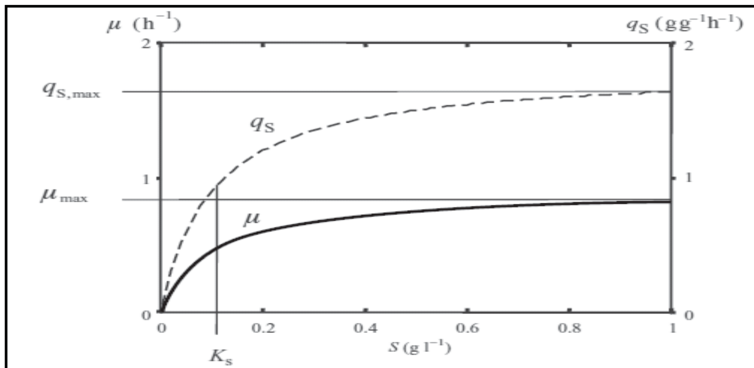
$$r = qX \tag{6.19}$$

بحيث q هو *معدل التفاعل النوعي*، أي المعدل لكل وحدة خلية. ويُستخدم عادةً دليل يشير إلى أيّ تفاعل يرجع المعدل q. كما أن معدل التفاعل النوعي للنمو (q_x) يُعبَّر عنه بشكلٍ شائع بـــ μ الذي هو معدل النمو النوعي.

1.3.19 نموذج مونود Monod Model

نموذج مونود هو نموذج شائع لوصف كيفية اعتماد معدل النمو على تركيز مادة أولية معين، S:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S+K_S} \tag{7.19}$$



الشكل 2.19: مخطط توضيحي لنموذج مونود. رسم بياني لمعدل النمو (μ, خط كامل) ولمعدل الأخذ النوعي (q_S، خط منقط) ضد تركيز المادة الأولية المقيِّدة (S)، مع افتراض أن مُعامل عطاء الكتلة الحيوية ثابت، $Y_{X/S} = 0.5$.

تفيد هذه المعادلة بأنه كلما كان تركيز المادة الأولية أعلى، كان معدل النمو أعلى، حتى يصل إلى

معدل النمو الأقصى، μ_{max}. وثابت الإشباع، K_S، هو تركيز S (المادة الأولية) عندما يكون معدل النمو نصف الحد الأقصى. وهذا موضح الشكل 2.19، الذي يُظهر أيضاً كيف أن المعدل النوعي لأخذ المادة الأولية (q_S) يتغير، باعتبار أن عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية هو دائماً مستقل عن تركيز المادة الأولية. إلا أن نادراً ما يكون هذا هو الحال. والكتلة الحيوية المنتَجة لكل مادة أولية غالباً ما تنحدر عند معدلات نمو منخفضة جداً (تراكيز المادة الأولية) وبذلك يكون نموذج مونود غير نافع لمحاكاة مزارع الدفعة المغذاة، وبالتالي هناك نموذج مقابل من أجل المعدل النوعي لأخذ المادة الأولية يُستخدم:

$$\mu = q_{S،max}\frac{S}{S+K_S} \qquad (8.19)$$

لاحظ أن قيم الـــ K_S في هذه النماذج ليست دائماً هي نفسها.

2.3.19 عطاء الخلية وادامتها Cell yield and maintenance

يُعرَّف مُعامل العطاء للتفاعل بأنه كمية المنتوج لكل مادة أولية مستهلكة، أي:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \qquad (9.19)$$

وكثيراً ما تُعرَّف بأنها النسبة للمعدَّلات المقابلة. عندئذٍ يعبّر عن مُعامل العطاء لنمو الخلية على المادة الأولية بـــ:

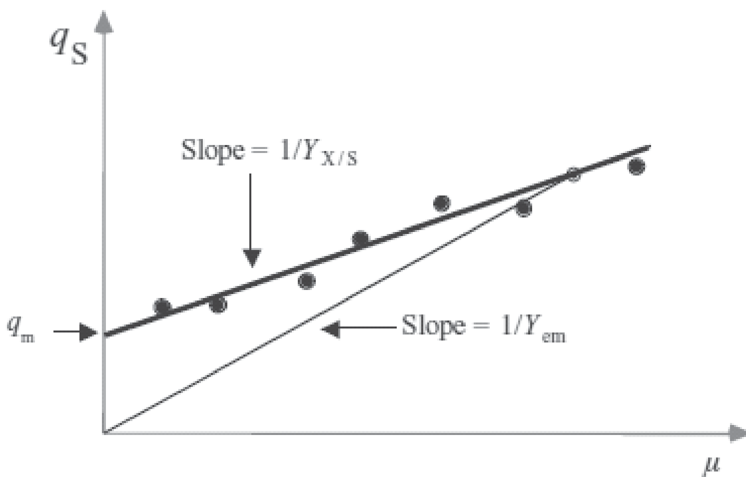
$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} \qquad (10.19)$$

إلا أن هذا العطاء غير ثابت عادةً، وينحدر عندما يصبح معدل النمو النوعي منخفضاً جداً من أجل طلب البقاء. هذا يمكن أن يوضّح برسم بياني لمعدل الأخذ النوعي مقابل معدل النمو النوعي، كما هو مبين في الشكل 3.19.

وبحسب الشكل 3.19، يمكن أن يُكتب معدل استهلاك المادة الأولية بطريقتين، اعتماداً على إذا ما كان البقاء مُتَضَمَّناً أم لا:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \qquad (\text{أ} -11.19)$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{em}} + q_m \qquad (\text{ب} -11.19)$$



الشكل 3.19: مفهوم البقاء. رسم بياني لمعدل استهلاك المادة الأولية النوعي (q_S) ضد معدل النمو النوعي (μ). يُظهر استقراء الرسوم البيانية هذه، أن مُعامل البقاء (q_m) هو عند التقاطع مع محور- q_S. يمثل مقلوب الانحدار للرسوم البيانية مُعامل العطاء باستثناء عطاء البقاء (Y_{em})، بينما مقلوب الانحدار للخط المرسوم من نقطة تجريبية إلى المركز يمثّل مُعامل العطاء الملاحظ ($Y_{X/S}$)K، الذي يعتمد على معدل النمو.

إذاً، هناك نوعان من مُعاملي العطاء للإنتاج الخلوي من موادّ أولية مثمرة للطاقة، وهما: *عطاء* الخلية الصافي *باستثناء عطاء البقاء* (*yield exclusive maintenance*)، المسمّى هنا Y_{em}، و*العطاء الملاحظ للكتلة الحيوية* (*observed yield of biomass*) لكل مادة أولية مستهلكة، المتضمِّن عطاء البقاء (المسمّى هنا ($Y_{X/S}$)). يُظهر إعادة ترتيب المعادلات (11.19 أ و ب) أن العطاء الملاحظ يعتمد على معدل النمو النوعي:

$$Y_{X/S} = \frac{\mu Y_{em}}{\mu + q_m Y_{em}} \qquad (12.19)$$

وتصبح أهمية البقاء جليّة في مزارع الكثافة الخلوية العالية، كما سيُبحث في فقرة مزارع الدفعة المغذاة في الأسفل.

3.3.19 معدل النمو النوعي ومعدل الأخذ للمواد الأولية غير المقيِّدة

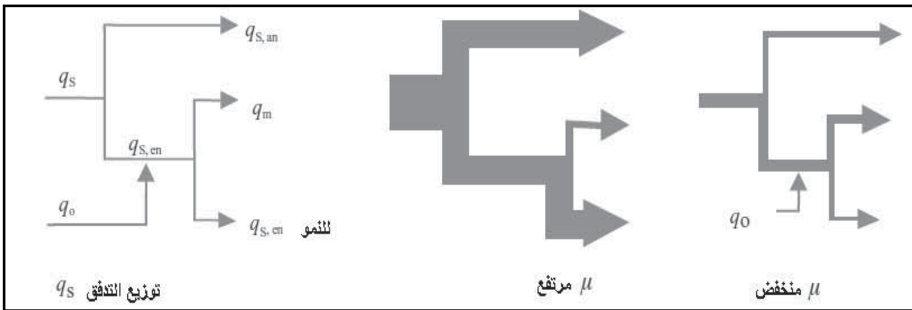
Specific growth rate and uptake rate of non-limiting substrates

يُحسب أولاً معدل الأخذ للمادة الأولية المقيِّدة (S) في مزارع الدفعة المغذاة، أو خلال ظروف ديناميكية في مزارع مستمرة، من خلال المعادلة (8.19). ثم يتم الحصول على معدل النمو النوعي باستخدام المعادلة (11.19 ب)، التي يمكن أن تُكتب بهذا الشكل:

$$\mu = Y_{em}(q_S - q_m) \qquad (13.19)$$

بينما يتم الحصول على معدل أخذ المادة الأولية المقيِّدة وفقاً لنموذج مونود، وتُحسب عادةً المواد الأولية غير المقيِّدة (سُمِّيت هنا S_2)على أساس معدل النمو وثابت العطاء للتفاعل، أي:

$$q_{S2} = \frac{\mu}{Y_{X/S2}} \qquad (14.19)$$



الشكل 4.19: نموذج لتدفقات مصادر الطاقة الكربونية داخل الخلية، حيث إن q_S هو المعدل النوعي لأخذ المادة الأولية. بعيداً عن هذا، يُستخدم $q_{na,S}$، لإدخال الكربون (C)، والهيدروجين (H)، والأكسجين (O) للخلايا (في عملية البناء)؛ بينما الباقي $q_{ne,S}$، يُستخدم لطاقة الأيض، الذي يُقسم بعد إلى تدفُّق مستخدم على سبيل طاقة من أجل البقاء (q_m) وإلى القسم الذي يؤمِّن

طاقة للنمو. عندما تنحدر q_s، كما في مزرعة الدفعة المغذاة بمعدل تغذية ثابت، فإن كلاً من $q_{na,s}$ و $q_{ne,s}$ ينحدر أيضاً. إلا أن طلب البقاء لديه الأولوية في مؤونة التخفيض للطاقة. والنتيجة أن نسبة تدفقات استهلاك الأكسجين ($q_{ne,s}$) وتدفق عدم الاستهلاك ($q_{na,s}$) تزيد، كما أُشير بنسبة عرض (اتساع) الأسهم. وهناك نتيجتان رئيسيتان عندما ينخفض معدل النمو النوعي، وهما أن: عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية مثمرة للطاقة ينخفض واستهلاك الأكسجين لكل وحدة مادة أولية يزيد.

4.3.19 معدل أخذ الأكسجين Oxygen uptake rate

في المزارع المستمرة، يمكن أن يكون معدل الأخذ للأكسجين قد قُدِّر بشكلٍ ملائم بواسطة معدل النمو ومُعامِل العطاء حسب المعادلة (14.19)؛ ولكن في مزارع الدفعة المغذاة بتغذيةٍ ثابتة، فإن المعدل النوعي للنمو والمعدل النوعي لاستهلاك المادة الأولية ينحدر تدريجياً، وهذا يجب أن يُبرَّر لفهم مزارع الدفعة المغذاة ذات الكثافة الخلوية العالية. يُمكن أن يُقسم استعمال مصدر الطاقة الكربوني (C-energy source) إلى تدفقين أيضيّين موازيين للاستهلاك من أجل إدخال العناصر C، O و H إلى الكتلة الحيوية، أي التدفق لعملية البناء ($q_{S,an}$) والتدفق الذي يفضي إلى عملية أكسدة من أجل إنتاج الطاقة، ($q_{S,en}$). كما يُمكن تقسيم هذا الأخير (التدفق الذي يفضي إلى عملية أكسدة) أيضاً إلى تدفقٍ يُستخدم من أجل البقاء (q_m) وتدفقٍ باقٍ يُستخدم على سبيل طاقة للنمو كما هو مصورّ في الشكل 4.19. في الواقع ليس هناك تدفقات منفصلة هكذا في عملية أيض الطاقة، لكن الفكرة ناجعة كنموذج.

$$q_S = q_{S,\,an} + q_{S,\,en} \qquad (15.19)$$

إن جميع الأكسجين المُستهلك تقريباً يُستخدم من قِبل الخلية للتنفُّس، إلا إذا كانت تستخدم الأكسجيناز (oxygense) لالتقاط المادة الأولية (حينما تنمو على الميثانول، أو الهيدروكربون، أو المركبات العطرية). يُؤمَّن الأكسجين الخلوي بشكلٍ رئيسي من مصدر الكربون (مثل الغلوكوز). لذلك، لنموٍ على مادة أولية مثل الغلوكوز، فإن استهلاك الأكسجين (q_O) متناسب مع تدفق المادة الأولية المستعملة

للطاقة ($q_{S,en}$) مع إدخال مُعامل قياس رياضي (stoichiometric coefficient) يُدعى $R_{O/S}$:

$$q_{O} = q_{S,\,en} + R_{O/S} \quad (16.19)$$

ولعملية تنفس قائمة على الغلوكوز، يكون $R_{O/S}$ مساوٍ لــ 6 mol من الأكسجين من جراء استخدام mole واحدة من الغلوكوز (6 mol oxygen mol^{-1} glucose) ، أو ما يُعادل 1.067 gg^{-1}.

يمكن الحصول على تدفق عملية البناء من توازن الكتلة على الكربون، بحيث يكون العطاء، باستثناء عطاء البقاء وتركيزات الكربون في الخلية معروفيْن.

تدفق الكربون لعملية البناء هو:

$$C_S q_{S,an} \qquad (\text{moles C } g^{-1} \text{cells } h^{-1}) \quad (\text{أ}-17.19)$$

وتدفق الكربون المحوَّل إلى كتلة حيوية هو:

$$C_X (q_S - q_m)\, Y_{em} \qquad (\text{moles C } g^{-1} \text{cells } h^{-1}) \quad (\text{ب}-17.19)$$

حيث يشكِّل C_S و C_X تركيز الكربون في المادة الأولية والخلايا، على التتالي. إن تدفقات الكربون هي متساوية وعندها، يمكن حل $q_{S,an}$ من المعادلة (17.19):

$$q_{S,\,an} = \frac{C_X}{C_S}\,(q_S - q_m)\, Y_{em} \quad (18.19)$$

بعد إدخال هذه المعادلة في معادلة (16.19) يتم الحصول على المعدل النوعي لاستهلاك الأكسجين:

$$q_O = \left[q_S\, \frac{C_X}{C_S}\,(q_S - q_m)\, Y_{em}\right] R_{O/S} \quad (19.19)$$

وأهمية هذا هو أن معدل استهلاك الأكسجين في عملية الدفعة المغذاة يزيد تدريجياً، بغضّ النظر عن التغذية الثابتة بالمادة الأولية. وهذا موضح أكثر في فقرة عملية الدفعة المغذاة في الأسفل.

5.3.19 معدل تحوُّل الأكسجين Oxygen transfer rate

في سائر المفاعيل الحيوية الجرثومية، فقط الأكسجين المنحل في الوسط هو الذي يُستهلك. إن ذوبان الأكسجين في الماء بتوازنٍ مع الهواء منخفض عادة، ويتراوح نموذجياً بين **8−6 mg L^{-1}** أو ما يُعادل 0.25−0.19 mM (وهي قيمة تعتمد على الحرارة **والوسط المستخدم**). إن هذا يوازي تقريباً إنتاج نفس الكميات من الخلايا في وسط مرتكز على السكر، لذلك يجب التزويد بالأكسجين بشكلٍ متواصل في العمليات الهوائية (Aerobic)، فمعدل تحوُّل الأكسجين من فقاعات هواء إلى أكسجين ذائب في الوسط (معدل تحوُّل الأكسجين، kg $m^{-3}h^{-1}$ أو الأكثر تداولاً، mmol l^{-1} h^{-1}) هو معيار (Parameter) مهم، لأنه يحدد تركيز الأكسجين في الوسط. يُمكن حسابة تركيز الأكسجين في الوسط وفق معادلة (3.19)، إذا كان تركيز الأكسجين في المخرج ومعدل جريان الهواء معروفَيْن. والنموذجُ العام لتقدير معدل تحوُّل الأكسجين هو كما يلي:

$$\mathrm{OTR} = K_{\mathrm{L}}a(C* - C) \qquad (20.19)$$

بحيث K_{L}a (h^{-1}) هو مُعامل تحوُّل الأكسجين الحجمي، C (kg m^{-3}) هو تركيز الأكسجين المذاب وC* هو موازٍ لتركيز الأكسجين في توازن مع طور الغاز، أي هو تركيز الأكسجين في فقاعات الهواء في المفاعل. إلا أن تركيز الأكسجين المذاب، C، من الصعب مراقبته، غير أن معياراً يرتبط به، وهو توتر الأكسجين المذاب (DOT)، متوفر من الأقطاب الكهربائية للأكسجين المعقمة بالبخار. يعبِّر الثابت H، أي ثابت هنري، (% إشباع الهواء m^3 kg^{-1}) عن العلاقة بين تركيز الأكسجين المنحل وتوتر الأكسجين المذاب.

$$\mathrm{DOT} = \mathrm{H}C \qquad (21.19)$$

تزيد قيمة H من 14286 إلى 1667 حين ينحدر ذوبان الأكسجين **من 7 إلى 6 mg l^{-1}** ، وهو نطاق ذوبان الأكسجين في وسط العملية.

6.3.19 معادلات توازن الكتلة النوعي

Specific mass balance equations

بناءاً على معادلة توازن الكتلة العام، ومعادلات (4.19) و (5.19)، ومعادلات المعدل النوعي لكلٍّ من المادة الأولية المقيِّدة، والنمو، واستهلاك الأكسجين، فإنه يُمكن كتابة معادلات توازن الكتلة التالية وحلها من أجل الحصول على تراكيز المادة الأولية المقيِّدة (S)، والكتلة الحيوية الحية (X_v)، و DOT. ولتبرير موت الخلية، تم إدخال ثابت معدل الموت من الدرجة الأولى (متناسب بشكلٍ مباشر) (k_d) في معادلة توازن كتلة الكتلة الحيوية، (22.19). تمثل المعادلات في الأسفل المزرعة المستمرة، بحيث يحدد عنصر التفريق (δ) إمكانية إعادة دوران الخلايا (انظر الشكل 1.19)، ونفس المعادلات أيضاً قابلة للتنفيذ في حالة عمليات الدفعة المغذاة، ولكن إذا تمَّ إهمال δ .

$$\frac{dX_v}{dt} = -\frac{F}{V}\,\delta X_v + \mu X_v - k_d X_v \tag{22.19}$$

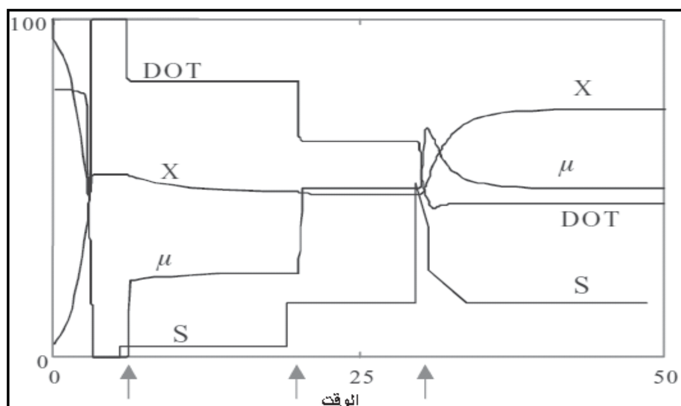
$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}\,(S_i - S) - q_S X_v \tag{23.19}$$

$$\frac{dDOT}{dt} = K_{La}(DOT* - DOT) - q_O X_v H \tag{24.19}$$

4.19 المزرعة المستمرة Continuous culture

يرافق العمليات المستمرة جريان دائم في الوسط خلال المفاعل. يتم التحكم بمعدل الجريان في مخرج الوسط بآلة، مثل آلة ضبط الوزن، التي تُبقي الكمية ثابتة في المفاعل، وبمعدل الجريان في مدخل الوسط بواسطة أحد هذه المبادئ: ففي *التيربيدوستات* (*Turbidostat*)، يُحدَّد الجريان في المدخل بواسطة الكثافة الضوئية (optical density) للزرع، ما يعني أنها مضبوطة على درجة ثابتة. وفي الـــــ *pH− أوكزوستات* (pH- auxostat)، يتم التحكم بالجريان لإبقاء الرقم الهيدروجيني ثابت. أما في الكيموستات (Chemostat)، فيُطبَّق جريانٌ ثابت في المدخل. والكيموستات هو أكثر متغير متقلِّب في المزارع المستمرة، فهو يسمح بنمو الخلايا على أيّ معدل تحتμ_{max}، لكنه لا يستطيع أن يعمل قريباً من μ_{max}

بسبب مشاكل عدم الاستقرار. إن الــ pH- auxostat هو متمِّم للكيموستات لأنه يسمح بالنمو على μ_{max}، بينما يصبح غير مستقر تحته. إن نظرية *الكيموستات* وخصائصه مقدمةٌ هنا باختصار.



الشكل 5.19: تفعيل الكيموستات وضبط معدل النمو وتركيز الكتلة الحيوية. تقوم محاكاة 1-40 عملية على أساس حل رقمي لمعادلات توازن الكتلة من معادلة (22.19) إلى معادلة (24.19). تتضمَّن المحاكاة طور دفعة أوَّلية مع نموٍّ تصاعدي وذلك لزيادة تركيز الكتلة الحيوية قبل انطلاق الكيموستات (عند السهم الأوَّل). إن تركيز المادة الأولية هو خارج النطاق خلال طور الدفعة. عند السهم الأوَّل، كان قد بدء جريان الوسط بـــ 10 ليتر سا$^{-1}$ مع S_i = 10 غرام ليتر$^{-1}$. عند السهم الثاني إزداد معدل الجريان إلى 20 ليتر سا$^{-1}$. يدل السهم الثالث إلى تغيرٍ في الوسط مع تركيزٍ أعلى للمادة الأولية المقيِّد في المدخل (S_i= 15 غرام ليتر$^{-1}$).

1.4.19 الكيموستات Chemostat

في الكيموستات يجب أن يكون واحداً من المكوِّنات من المواد الأولية محدوداً. عملياً، غالباً ما يكون هو الكربون (مصدر الطاقة) لكن محدودية مواد مغذية أخرى يمكن أن تُستخدم أيضاً. تتحقق المحدودية إذا لم يتجاوز معدل التغذية بالمادة الأولية في المدخل معدل استهلاك المادة الأولية الأقصى:

$$\frac{F}{V} S_{\mathrm{i}} < q_{\mathrm{S,max}} X \qquad (25.19)$$

إذا لم يكن تركيز المادة الأولية هو مقيِّد السرعة، فإن النمو سيستمر عند μ_{max}وX ستزيد حتى الوصول إلى محدودية بإحدى المواد الأولية. شكل 5.19 يعرض

محاكاة ديناميكية لتفعيل الكيموستات وشرطي حالة الاستقرار بتراكيز كتلة حيوية ومعدلات نمو مختلفة. تُصمِّم العمليات المستمرة لتعمل في حالة الاستقرار، ويتم القيام برسم بياني للمتغيرات ضد *معدل التخفيف*، $D = F / V$، الذي هو مقلوب *زمن المكوث*، $\tau = V / F$. يمكن الحصول على قِيَم حالة الاستقرار لمتغيرات العملية X_y، X_d، S، S_2، DOT، و P من خلال حلولٍ تحليلية لمعادلات وثيقة الصلة بتوازن الكتلة، وذلك في شروط حالة الاستقرار، أي حين $dy/dt = 0$، كما هو ملخَّص في الجدول 1.19.

لاحظ الترتيب للمعايير الثلاثة (μ، S، وX_y) ومن أي معادلات تمَّ حلُّها! اشتُقَّت المعايير الأخرى (X_d، DOT، S_2، و P) من معادلات توازن الكتلة الخاصة بكل عامل.

الجدول 1.19: استنتاجات حلول حالة الاستقرار للكيموسات

المعادلة النموذج		الحل في حالة الاستقرار	المعادلة
MB on biomass $\frac{dX}{dt} = -\frac{F}{V}\delta X_v + \mu X_v - k_d X_v$	$\longrightarrow$	معدل النمو النوعي $\mu = \delta D + k_d$	(19.26)
نموذج مونود $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}$	$\longrightarrow$	تركيز المادة الأولية المقيِّدة $S = \frac{\mu K_s}{\mu_{max} - \mu}$	(19.27)
MB on limiting substrate $\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_i - S) - q_s X_v$	$\longrightarrow$	تركيز الكتلة الحيوية $X_v = \frac{DY_{X/S}}{\mu}(S_i - S)$	(19.28)
MB on DOT $\frac{dDOT}{dt} = K_L a\,(DOT^* - DOT) - q_o X_v H$	$\longrightarrow$	الأوكسيجين المنحل $DOT = DOT^* - \frac{\mu X_v H}{Y_{X/o} K_L a}$	(19.29)
MB on non-limiting substrate $\frac{dS2}{dt} = \frac{F}{V}(S2_i - S2) - q_{S2} X_v$	$\longrightarrow$	تركيز المادة الأولية الغير مقيِّدة $S2 = S2_i - \frac{\mu X_v}{Y_{X/S2} D}$	(19.30)
MB on product $\frac{dP}{dt} = -\frac{F}{V} P + q_P X_v$	$\longrightarrow$	تركيز المنتج $P = \frac{q_P X_v}{D}$	(19.31)

يُظهر الجدول 2.19 حساباً بسيطاً لمحاكاة قيم حالة الاستقرار في الكيموستات باستخدام MATLAB (وهو برنامج محاكاة معروف). يمكن استخدام هذا الحساب (مع ثوابت معدلة) لتوضيح أداء الكيموستات.

أدخل هذا النص في m-file في MATLAB (سمِّيه مثلاً، chemostat.m) وشغِّل المحاكاة بإدخال الأمر "chemostat" في نافذة الأمر في الــ MATLAB.

لاحظ إشارة الاستجابة (')، طريقة العنصر في إشارات التشغيل (./ و .*) ومجموعة حروف النص مضمومة بإشارات اقتباس مفردة ('')! النص بعد إشارة % في الشيفرة هي تعليقات، وهي مهملة من قِبل الـ MATLAB عندما يعمل m-file. سوف تبيِّن المحاكاة:

- أنَّ تركيز المادة الأولية المقيِّدة هو قريب من الصفر على مدى واسع من معدلات التخفيف. لا يزيد فعلياً تركيز المادة الأولية المقيِّدة قبل أن يقترب معدل التخفيف من قيمة حاسمة بحيث تكون الخلايا قد أُزيلت. يتم الحصول على معدل التخفيف الحرج من المعادلة (26.19)، ولأن الخلايا لا تستطع أن تنمو أسرع من $\mu_{\max}$ فستكون المعادلة:

$$D_{\text{crit}} = \frac{\mu_{\max} - k_{\text{d}}}{\delta} \tag{32.19}$$

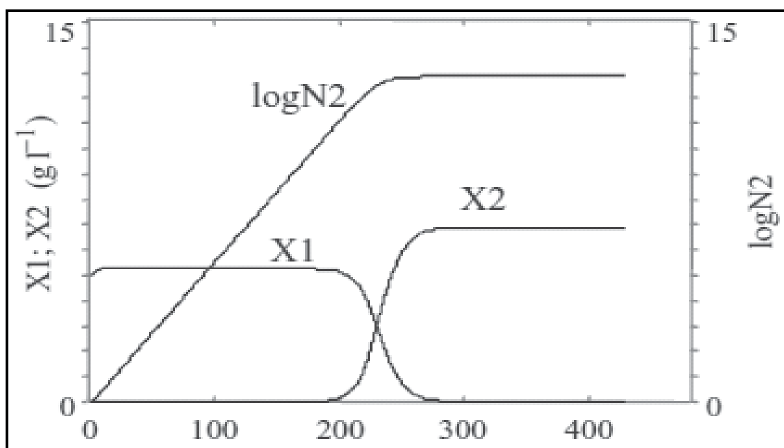
الجدول 2.19: حساب الMATLAB لمحاكاة حالة الاسقرار في الكيموستات

```
clear all
kd=0; delta=1;Mymax=0.8; Ks=0.01; Yem=0.5;
qm=0.04;Si=9;DOTstar=100;Yxo=1;H=14000;
KLa=800;S2i=0.5;Yxs2=10;alpha=0;beta=0;
% make an x-column vector
D=0.05:0.01:1;
D=D';
% y-vectors according to models:
My=delta*D+kd;
S=My*Ks./(Mymax-My);
S(find(S<0))=Si;   % correction for boundary conditions
S(find(S>Si))=Si;   % correction for boundary conditions
Yxs=My*Yem./(My+Yem*qm);
Xv=D./My.*Yxs.*(Si-S);
Xd=kd*Xv./(delta.*D);
DOT=DOTstar-My./Yxo.*Xv*H/KLa;
S2=S2i-My./Yxs2.*Xv./D;
rXv=My.*Xv;
qp=alpha*My+beta;   % Luedeking-Piret model
P=qp.*Xv./D;
% make matrix with y-variables in columns
y=[S, Xv,Xd,DOT,S2,rXv,P];
% enter scale max for each variable
ymax=[10,10,10,100,1,10,5];
% scale values to a 0–100 scale
for i=1:length(ymax)
   yscaled(:,i)=y(:,i)/ymax(i)*100;
end
% make plots and labels
yplot=plot(D,yscaled);
set(gca,'YLim',[0 100])
XLabel('D (/h)')
YLabel('rel. values')
title('Simulation of steady-state in a chemostat')
legend('S:0–10','Xv:0–10','Xd:0–10','DOT:0–100','S2:0–1','r
   10','P:0–5')
```

- أنَّه يصبح معدل التخفيف الحرج مساوياً لــ μ_{max} في زرعٍ من دون موت للخلايا ($k_d = 0$)، ومن دون عملية إعادة الدوران لها ($\delta = 1$). تطبيقياً، يصبح الكيموستات غير مستقر عندما يقترب معدل التخفيف من القيمة الحاسمة.
- أنَّ تركيز المادة الأولية المقيِّدة في الكيموستات يتم تحديدها من خلال قيمة K_S. لذلك كلَّما قلَّ الــ K_S قلَّ معه تركيز المادة الأولية؛ غير أنَّ معدل التخفيف يبقى تأثيره ضئيلاً إلى أن يقترب من معدل التخفيف الحرج.
- أنَّ تركيز الخلايا هو ثابتٌ نسبياً على مدى واسع من معدلات التخفيف. فهو ينخفض بسرعة عند كِلٍّ من معدلات التخفيف: المرتفعة بسبب التركيز المرتفع للمادة الأولية المقيِّدة في المخرج، والمنخفضة بسبب موت الخلايا وانخفاض عطاء الكتلة الحيوية الملاحظ في أغلب الأحيان باستخدام المادة الأولية الطاقة (المثمرة للطاقة). تتراكم أكثر الخلايا الميتة في حالة موت الخلايا الملحوظ، لدى معدلات تخفيف منخفضة. ولأن تركيز الخلايا الحية يتقلَّص عند معدلات التخفيف هذه (المنخفضة)، فإنه يمكن توقع زيادة قابلية نمو الزرع ((X_y / ($X_y + X_d$)) عند معدلات تخفيف مرتفعة (بشرط أن يكون معدل الموت النوعي، k_d، ثابتاً).
- أنَّه تزيد تقريباً، وبشكلٍ متناسب مع معدل التخفيف، إنتاجية الكتلة الخلوية التي تعتمد على تركيز الكتلة الحيوية والمعدل النوعي للنمو. فكلَّما باتت إنتاجية الخلايا أعلى بات معدل استهلاك الأكسجين أعلى. وبذلك إذا لم يوَفِّ معدل تحوُّل الأكسجين الطلب، فإن الكيموستات يتحوّل إلى كيموستات محدود الأكسجين.
- أنَّ تركيز المادة الأولية الغير مقيِّدة (ما عدا للــ DOT) متوازٍ مع تركيز المادة الأولية المقيِّدة، إلا أنه يقع (للغير مقيِّدة)على تركيز أعلى. إذا زاد تركيز المادة الأولية المقيِّدة في المدخل (فقط S_i)، فسوف يُؤدي إلى انخفاض في تركيز المادة الأولية الغير مقيِّدة، مما يوجِد حالة فيها نوعٌ من المحدودية قد تحوّل (shifted). ويمكن إضافة جرعة من المادة الأولية

المقيِّدة المقصودة لاختبار إذا ما كانت هي المادة الأولية المقيِّدة الحقيقية. ثم يتم التأكد من ذلك بالاستجابة العابرة التي تظهر كزيادة في تركيز الخلايا أو انخفاض في الـــ DOT، في حين أن فقدان مثل هذه الاستجابة يدل على أن بعض المواد الأولية الأخرى هي المقيِّدة.

- أنَّ تركيز المنتج في الكيموستات يعتمد أكثر على النوع لحركيات تشكيل المنتج كما يصِف نموذج لودكنغ بيريت (Luedeking Piret model) (متضمَّن في شيفرة الـــ MATLAB، جدول 1.19). فالمنتجات المتصلة بالنمو هي الأكثر ملاءمة لعملية الإنتاج في الكيموستات، لأن تركيز المنتجات المتصلة بعدم النمو تصبح مخففة حتى قيمٍ منخفضة لدى معدلات تخفيف عالية. وعندما تكون التراكيز الملاحظة عالية لدى معدل تخفيف منخفض في المزرعة المستمرة، يتم الحصول فيها على إنتاجية منخفضة وفائدة ضئيلة مقارنةً بعملية الدفعة المغذاة، التي تعطي أعلى تركيز للمنتج.



الشكل 6.19: محاكاة لاقتباسٍ طافر في 1–10 كيموستات. تمتلك هذه السلالة h^{-} $= 1.6\ g\ g^{-1}$ sq_{axm}^{1}، $K_S = 0.01\ g\ l^{-1}$، و $Y_{X\backslash S} = 0.36 gg^{-1}$. عند الزمن صفر، أُدخلت خلية واحدة من دون بلازميد في المحاكاة بقيمة خاصية انحراف $Y_{X/S} = 0.46\ gg^{-1}$ فقط. يُظهر منحنى اللوغريثم لـــ N2 (log N2) أن الطافر ينمو بشكم تصاعدي، إلا أنه لا يؤثر في توازن الكتلة بشكلٍ قابل للقياس حتى بعد حوالى 200 ساعة، عندما يكون الكائن (Xl) قد أُزيل وحل محله الطافر (X2).

إن الأفضلية المهمة للكيموستات مقارنةً بعمليات الدفعة وعمليات الدفعة المغذاة هي الإنتاجية المرتفعة. إضافةً إلى ذلك، أصبح الكيموستات وسيلة مهمة

للبحث في علم وظائف الجراثيم لأن الخلايا فيه تنمو تحت شروطٍ ثابتة على معدل نمو وكثافة خلوية دقيقيْن. أما الانسحاب الذي أعاق الاستخدام الصناعي للكيموستات فهو عدم الاستقرار الجيني بشكلٍ رئيسي. فمحدودية الكيموستات الأساسية الضمنية هي في ضبط الأيض، يعني الحساسية من الطفرات. هذا يعود إلى حقيقة وجود توازن بين معدل النمو وتركيز المادة الأولية.

وربما إذا تمَّ التلاعب بالكائن ليفرط في إنتاج كميات كبيرة من المنتج، فإن الطفرة التي تزيل أو تُقلِّص تشكيل المنتج تمنح أفضلية تنافسية. الشكل 6.19 يعرض مثالاً مع معطيات من البكتيريا القولونية الإشريكية (*E. coli*) W3110، التي تمتلك $0.46 g\ g^{-1}$ مُعامل عطاء للكتلة الحيوية من غير بلازميد . أما عند إدخال بلازميد لإنتاج بروتين TZZ2، فإن مُعامل العطاء ينخفض إلى $0.35\ g\ g^{-1}$. وفي المحاكاة، افتُرض أن خلية واحدة من دون بلازميد ظهرت عند بدء المحاكاة، وبعد حوالى 200 ساعة سيطر هذا الكائن في المنافسة، وحلّ فعلياً محل الكائن المنتج.

5.19 مزارع الدفعة المغذاة Fed-batch culture

معظم عمليات التخمير الصناعية مسمَّاة بعمليات الدفعة المغذاة، التي هي عمليات تغذية بمحلول مادة أولية على دفعات، بحيث واحد من مكوِّنات المادة الأولية يكون مقيِّداً لمعدل النمو. غالباً ما تكون المادة الأولية الغذاء هي السكر غير الوسط الكامل، ومن المُتداول أن يكون تركيز المادة الأولية مرتفعاً بقدر ما يُمكن تطبيقياً من أجل تخفيض زيادة الحجم. لذلك تُستخدم غالباً محاليل سكر بتراكيز تتراوح بين 30 و50%. هناك سببان رئيسيان لاستعمال تقنية الدفعة المغذاة؛ أولاً، تقديم محدودية المادة الأولية وسيلةً لـ*ضبط معدل التفاعل* من أجل تجنُّب محدوديات الهندسة من حيث التبريد وتحوُّل الأكسجين. وثانياً، إتاحتها (محدودية المادة الأولية) تصنيف الضبط الأيضي، بحيث يُمكن تجنُّب عمليات كبح الهدم وأيض السكر المفرط الجريان (Sugar over-flow metabolism).

لن تصل عمليات الدفعة المغذاة إلى حالة الاستقرار، وبذلك لا يمكن استخدام المحاليل المستخدمة في المزارع المستمرة. عِوضاً عن ذلك، يجب علينا

حل معادلات توازن الكتلة رقمياً من قِيَم أوَّلية معطاة، ثم نقوم بوضع رسم بياني للمتغيِّرات ضد الزمن. وبما أن معادلة توازن الكتلة العام لعملية الدفعة المغذاة، معادلة (5.19)، هي مطابقة لتلك المستخدمة في الكيموستات من دون إعادة دوران، معادلة (4.19) مع $\delta = 1$ ، فإنه يمكن استخدام معادلات توازن الكتلة على جهة اليسار في الجدول 3.19 في مزارع الدفعة المغذاة. إلا أنه عند حساب معدل النمو النوعي، فإنه يجب استخدام المعادلة (13.19) لتبرير انحدار عطاء الكتلة الحيوية لدى زيادة الكثافة الخلوية (معدل نمو منخفض).

الجدول 3.19: حسابات MATLAB لمحاكاة الدفعة المغذاة

File name: FBstart

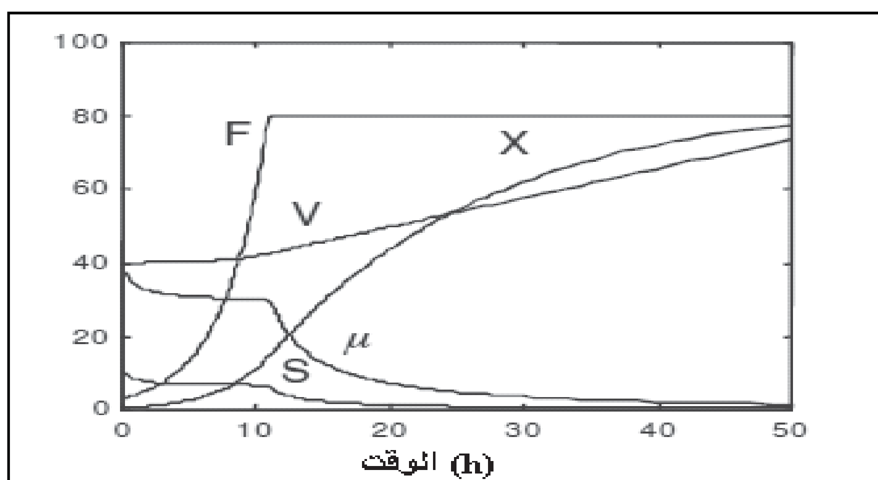
```
%FBstart; Initiation file for fed-batch simulation
% Requires a separate model file
clear all
global y2
y2=[];% for storage non-diff equation variables
tspan=[0 50];%% time scale
% enter initial values and locate in column vector
X=0.5;
S=0.1;
V=40;
y=[X; S; V];
% call ODEsolver and the model file
[t y]=ODE23s('FBmodel',tspan,y);
% option if non-diff eq. solutions are included
if is empty(y2)==0
% eliminate duplicates
y2(find(diff(y2(:,1))<diff(tspan)/1000),:)=[];
y2(find(diff(y2(:,1))<0),:)=[];
%match to y-vector size
y2=interp1(y2(:,1),y2(:,2:length(y2(1,:))),t);
% merge with y-vector
y=[y,y2];
end
% scale max values for scaling in graph
ymax=[100,1,100,1,1];% X,S,V,F,My
% scale values to a 0–100 scale
for i=1:length(ymax)
yscaled(:,i)=y(:,i)/ymax(i)*100;
end
%plot and label
yplot=plot(t,yscaled);
set(gca,'YLim',[0 100])
legend('X: 0–100 g/L','S: 0–1 g/L','V: 0–100L', . . .
'F: 0–1L/h','My: 0–1 /h')
xlabel ('time (hrs)')
title('Fed-batch with exponential/constant feed')
figure(gcf)
```

Filename: FBmodel.m

```
function dydt=FBmodel(t,y)
% Model file to be initiated by FBstart.m
% extract variables from y-vector
global y2
X=y(1);
S=y(2);
V=y(3);
%Constants
qSmax=1.6;
Ks=0.1;
qm=0.04;
Yem=0.5;
Si=500;
F0=0.03;
SFR=0.3;
Fmax=0.8;
%Algorithm
F=F0*exp(SFR*t);
if F>Fmax
   F=Fmax;
end
qS=qSmax*S/(S+Ks);
My=(qS-qm)*Yem;
dXdt=-F/V*X+My*X;
dSdt=F/V*(Si-S)-qS*X;
dVdt=F;
% make a dydt-column vector
dydt=[dXdt; dSdt; dVdt];
% store non-diff variables in y2
y2=[y2;[t,F,My]];
```

علاوةً على ذلك، يجب حساب معدل استهلاك الأكسجين النوعي لتبرير طلب الأكسجين المتزايد لكل وحدة من المادة الأولية الطاقة لدى معدل نمو منخفض، وذلك على أساس التقاسم بين عملية هدم وعملية أيض الطاقة، انظر الشكل 4.19 ومعادلة (19.19).

يحتوي الجدول 3.19 حسابات بسيطة للمحاكاة في مزرعة الدفعة المغذاة، والمُستثنى منه الأيض المفرط الجريان واستهلاك الأكسجين. يُستخدم ملف *Fbstart.m* لإعطاء الشروط الأصلية (الأولية) وليستدعي حلّاً للمعادلة التفاضلية ODE23S من MATLAB (في السطر الثالث عشر من الشيفرة). تُخزَّن المعادلات النموذج والثوابت في الملف المساعد *Fbmodel.m*. وتُعبَّأ جميع المتغيرات التي تمَّ حسابها في قالب y2matrix في *ml.Fbmode*، ثم يرجع برنامج التحكم إلى الملف *Fbstart·m* (في السطر 15) حيث تُكتب تحديدات الرسم البياني. النتيجة معروضة في الشكل 7.19.



الشكل 7.19: محاكاة مع حسابات للجدول 3.19. بدأ معدل التغذية (*F*) بقيمة منخفضة، موازية لمعدل الاستهلاك للقاح (inoculums). لقد زيد *F* بشكلٍ تصاعدي بقيمة أقل من μ_{max}، للحفاظ على نمو تصاعدي مع $\mu < \mu_{max}$. لقد أُبقي معدل التغذية ثابتاً عندما تمَّ الوصول إلى F_{max}، من أجل اجتناب DOT منخفض جداً (DOT غير مُتضمَّن في هذه المحاكاة). تعرض المحاكاة نمطاً نموذجياً من تركيز مادة أولية مقيِّدة، ومعدل نمو، وتركيز الكتلة الحيوية لمزرعة الدفعة المغذاة.

1.5.19 مزارع الكثافة الخلوية العالية High cell density culture

تُعتبر إمكانية الوصول إلى تراكيز عالية جداً من الكتلة الحيوية سمة مثيرة ومميزة لتقنية الدفعة المغذاة، غير متاحة من قبل أنماط أخرى من التشغيل. يمكن من خلال منحنى تركيز الكتلة الحيوية في الشكل 7.19، أن يحصل لأحدٍ ما انطباع بأن تركيز الكتلة الحيوية يزيد بشكلٍ مستمر ومتناسب مع معدل التغذية، وآخر يمكن فقط أن ينتظر للوصول إلى كثافة خلوية مرتفعة. إلا أن تقنية الدفعة المغذاة هي أيضاً محدودة بالنسبة إلى الكثافة الخلوية التي يمكن الوصول إليها. وهكذا إذا تمَّ تمديد العملية حتى كثافة خلوية عالية جداً، فإن عدداً من التأثيرات يمكن أن تُواجه. أما إذا كان الغذاء يحتوي على مادة أولية واحدة فقط، مثل السكر، فإن محتويات الوسط سوف تُستنزف عاجلاً أم آجلاً. لذلك تكون الاستجابة الأولى لهذا بزيادة تراكيز المكونات. بحيث يمكن حسابة المواد الأولية المطلوبة لإنتاج كتلة حيوية محددة من خلال معامل العطاء، الذي يمكن تحديده في تجارب الدفعة. هناك عمليات مكمِّلة يجب القيام بها بحذر لأن التركيز الأوَّلي العالي جداً للأملاح قد يكون مثبطاً أو مؤدياً إلى عملية ترسب. والاستراتيجية الأخرى التي يمكن القيام بها أيضاً هي استخدام هذه المكونات في التغذية على معدل غير مُقيِّد بالتوازي مع مواد أولية مُقيِّدة.

إن مصدر الآزوت المستخدم غالباً في تقنية الدفعة المغذاة هو الأمونيا لضبط الرقم الهيدروجيني. ينحدر تدريجياً معدل النمو النوعي خلال عملية الدفعة المغذاة مع معدل تغذية ثابت، لأن تركيز الكتلة الحيوية يزيد مع الزمن، كما هو مبين في الشكل 7.19. مما يدل على أن هناك تركيزاً خلوياً أقصى نظري عندما تقترب μ من معدل التخفيف في مزرعة الدفعة المغذاة.

من أجل الوصول إلى كمية (kg) خلوية عالية، فإنه من المهم الحفاظ بقدر الإمكان على بقاء منخفض ومعدل تغذية مرتفع. كما أنه من أجل الوصول إلى كثافة خلوية عالية ($kg\ m^{-3}$)، يجب أن يكون محلول التغذية مركزاً أيضاً بقدر الإمكان من أجل تخفيض التخفيف الناتج من التغذية. في العمليات الصناعية مع

استخدام موادّ خام معقدة، مثل الدبس المستخدم في عمليات الدفعة المغذاة، فإنه يمكن أن تتراكم في المفاعل التراكيز العالية من الأملاح ومواد مثبطة أخرى موجودة في الدبس غير مستعملة من قِبل الخلايا مما يؤدي إلى زيادة البقاء. كما أن معدل التغذية الأقصى مقيَّد بسعة تحوُّل الأكسجين في المفاعل.

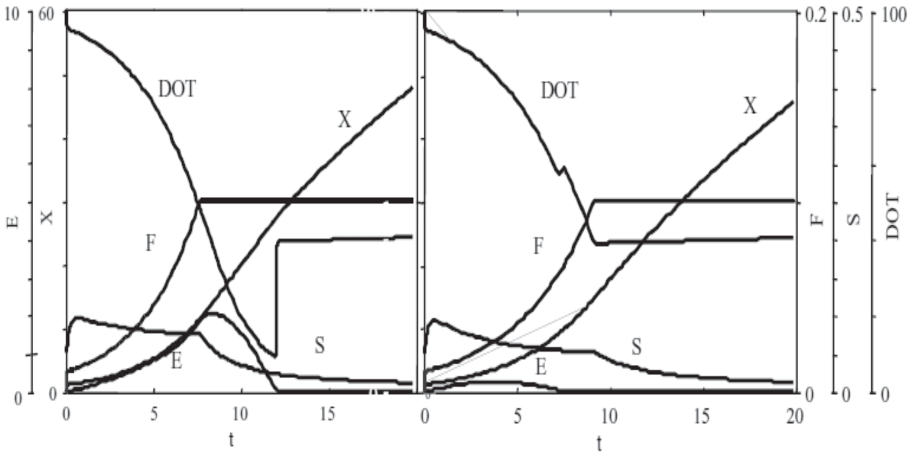
2.5.19 ضبط النمو التصاعدي في مزارع الدفعة المغذاة

Control of exponential growth in fed-batch culture

هناك سببان أساسيان لاستعمال تقنية الدفعة المغذاة: أولاً، لاجتناب محدوديات الهندسة المتعلقة بانتقال الأكسجين أو السخونة، وثانياً لضبط جريان الأيض المفرط أو لتنظيم الهادم. بالنسبة إلى محدوديات الهندسة، فهي لا تظهر حتى تكون المزرعة قد وصلت إلى كتلة حيوية جديرة بالاعتبار. وبذلك إذا كان هذا هو السبب فقط لاستعمال تقنية الدفعة المغذاة، إذاً يمكن جعل العملية تعمل كعملية الدفعة الواحدة مع فائض كل محتويات الوسط حتى الاقتراب من المحدودية. أما بالنسبة إلى الأيض المفرط الجريان، في حالة كون المطلوب الحد من عملية الأيض منذ بداية العملية، مثلاً لتجنُّب انتاج منتجات ثانوية سامة، فهذا يستدعي وجودَ معدلِ تغذيةٍ ثابتاً وموازياً لمعدل الاستهلاك المنخفض أصلاً، مما يؤدي إلى إنتاجية منخفضة من غير داعٍ. الحل لهذه المشكلة هو استعمال طور أوَّلي ذي نموٍّ تصاعدي عند معدل نمو نوعي، ثابت، لكنه مضبوط باستعمال معدل تغذية متصاعد لإبقاء تركيز المادة الأولية تحت القيمة الحرجة للأيض المفرط الجريان. ولأن هذا ينتهي إلى معدل استهلاك للأكسجين متصاعد، فإن سعة انتقال الأكسجين سوف تكون فعلياً غير كافية، كما في مزرعة الدفعة العادية. آنذاك يجب للتغذية المتصاعدة أن تُحوَّل إلى تغذية ثابتة. إن استراتيجية التغذية هذه، هي الاستراتيجية النموذجية المستخدمة لضم الإنتاجية المرتفعة وتشكيل الإيثانول المنخفض في عملية إنتاج خميرة الخبز، كما أنها أيضاً الاستراتيجية المستخدمة في معالجة القولونية الإشريكية (*E.coli*) لاجتناب التشكيل المفرط للأسيتات.

إن المبدأ معروض من خلال المحاكاة في الشكل 8.19. ولاستنتاج العبارة الجبرية للتغذية المعتمدة على الزمن والمطلوبة في تحقيق معدل نمو ثابت على μ > μ_{max} فإننا نبدأ من توازن الكتلة على مادة أولية مقيِّدة:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_i - S) - q_S X = 0 \quad (33.19)$$



الشكل 8.19: محاكاة ضبط الأيض المفرط الجريان في معالجة الخميرة S. cerevisiae. الفرق الوحيد في ضبط المزرعتين هو قيمة (دليل) التصاعد لمعدل التغذية، فهو $0.3\ h^{-1}$ في المزرعة من جهة اليسار و $0.25\ h^{-1}$ في تلك التي من جهة اليمين.

لأن $S_i >> S$ ، يمكن أن تُبسَّط هذه المعادلة لإيجاد F :

$$F = \frac{q_S(XV)}{S_i} \quad (34.19)$$

ولكن لأن XV تزيد مع الزمن، فإن F يجب أيضاً أن تزيد تصاعدياً مع الزمن تبعاً لـــ:

$$(XV) = (XV)_0 e^{\mu t} \quad (35.19)$$

حيث الرمزان السفليان 0 و t يدلّان على القيمة الأصلية (الأولية) وعند الزمن t، على التتالي. يتم الحصول من خلال ضم المعادلتين (34.19) و (35.19)، على معدل جريان التغذية المُعتمِد على الزمن الذي يُمكِّن الخلايا من النمو على معدل النمو النوعي μ:

$$F(t) = \frac{q_s}{S_i}(XV)_0 e^{\mu t} \quad (36.19)$$

والذي يمكن أن يُكتب كما يلي:

$$F(t)=F_0 e^{\mu t} \quad (37.19)$$

بحيث F_0 هو معدل التغذية الأولّي، ويتم الحصول على تقدير لمعدل التغذية هذا من:

$$F_0 = \frac{\mu}{S_i Y_{X/S}}(XV)_0 e^{\mu t} \quad (38.19)$$

تُستخدم تقنية التغذية المتصاعدة بشكلٍ رئيسي لضبط الأيض المفرط الجريان في الطور الأوّلي من عملية الدفعة المغذاة، كما هو موضَّح في الشكل 8.19. وطوال كون مُعامل العطاء $Y_{X/S}$ ثابتاً ، فإن تطبيق هذه العملية يجعل نمو الخلايا على أيٍّ معدل نمو ثابت أقل من μ_{max} أمراً ممكناً. لقد تم رصد الأيض المفرط الجريان في كلٍّ من القولونية الإشريكية (*E.coli*) والخميرة *S.cerevisia* عندما تخطت μ القيمة $0.3\ h^{-1}$، بعد ذلك، انخفض المُعامل $Y_{X/S}$ إلى حدٍّ بعيد ولم يُحقَّق معدل النمو الثابت.

إن الاستراتيجية النموذجية للدفعة المغذاة عند القولونية الإشريكية (*E.coli*) والخميرة *S.cerevisia* هو باستعمال معدل تغذية سيمائي يُفضي إلى بعض الأسيتات أو الإيثانول خلال التغذية المتصاعدة، ومن ثم إلى تحوُّلٍ لتغذية ثابتة عند اقتراب الـــ DOT من حوالى 20–30%. فيما بعد يبدأ تركيز المادة الأولية بالانحدار حيث يُستهلك الأسيتات/الإيثانول بسرعة. وتبقى التغذية ثابتة إلى أن ينحدر العطاء بشكلٍ كبير.

6.19 قراءات إضافية   Further reading

Anderson, L., L. Strandberg, L. Häggström, and S. O. Enfors, "Modelling of High Cell Density Fed-Batch Cultures," *FEMS Microbiology Reviews,* vol. 14 (1994), pp. 39-44.

Pham, H., G. Larsson, and S. O. Enfors, "Growth and Energy Metabolism in Aerobic fed-batch Cultures of Saccharomyces cerevisiae*:* Simulation and Model Verification," *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 60 (1998), pp. 474-482.

Pham, H., G. Larsson, and S. O. Enfors, "Modelling of Aerobic Growth of Saccharomyces cerevisiae in a pH-auxostat". *Bioprocess Engineering,* vol. 20 (1999), pp. 544-573.

Xu, B., M. Jahic, and S. O. Enfors, "Modelling of Overflow Metabolism in Batch and Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*," *Biotechnology Progress*, vol. 15 (1999), pp. 81-90.

الفصل العشرون

التقانة الحيوية للأنزيم

Enzyme Biotechnology

Randy M. Berka | **راندي م. بيركا**

Novozymes Biotech, Inc., USA | **شركة نوفوزيمز للتقانة الحيوية، الولايات المتحدة الأميركية**

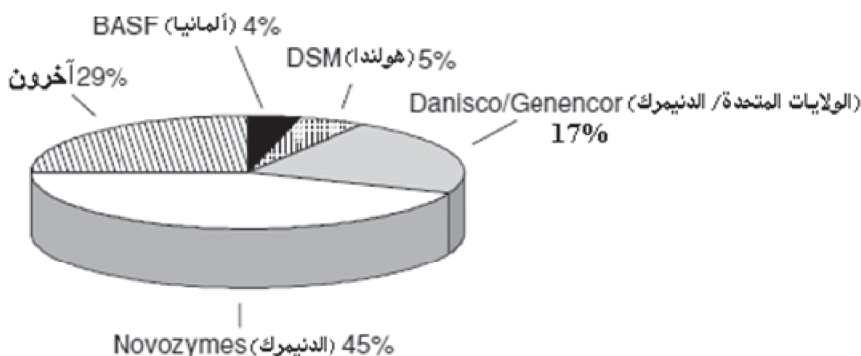
Joel R. Cherry | **جويل أر. شيري**

Novozymes Biotech, Inc., USA | **شركة نوفوزيمز للتقانة الحيوية،**

1.20 المقدمة Introduction

يواجه المجتمع عدداً من التحديات الهامّة على الصعيدين الاجتماعي–اقتصادي والبيئي: كالاحتباس الحراري، وانقراض أنواع من الكائنات في أنظمة بيئية هامة، وسوء التغذية، ونقص المياه وموارد طبيعية أخرى. كل هذه هي مشاكل صنعها الإنسان، وهي تتطلب حلولاً مبتكرة. ففي الوقت الذي يتواصل فيه تناقص الموارد الطبيعية الثمينة يتزايد عدد المستهليكن والملوثات. إن أحد التحديات الأساسية في المستقبل يتمثل بتطوير منتجات أقل خطورة، وتلويثاً وتطلباً للطاقة. وهي هنا، الأنزيمات التي باستطاعتها أن تؤثر في مستقبل المجتمع. في العام 1878، صاغ كوهنه Kühne مصطلح أنزيم Enzyme من الكلمة اليونانية إنزومَس *Enzumos*، التي تشير إلى تخمر الخبز بواسطة الخميرة. أما الاصطلاح الحديث فيشير إلى الحفازات الحيوية في هيئة بروتينات تسهل حدوث التفاعلات الكيميائية في الخلايا. تتم التفاعلات المحفَّزة أنزيمياً تحت شروط معتدلة نسبياً، وصديقة للبيئة. والأنزيمات هي

نوعية من الكيميائيات حساسة للغاية وتسرّع إلى حد كبير معدلات التفاعلات التي تشارك فيها، كما أنها تستخدم المواد الخام بشكل أفضل، وتوفر في استهلاك الماء والطاقة، وغالباً ما تحل محل عمليات كيميائية سامة.



الشكل 1.20: أكبر مصنعي الأنزيمات الصناعية وحصة كل منهم من السوق العالمية التي تقدر بـــ 2 بليون دولار أمريكي

وعلى سبيل المثال، إن أنزيمات البكتيريا والفطريات التي توجد في مخلفات الغابات هي المسؤول الأول عن تحطم وتفكك الكتلة الحيوية النباتية، لذلك، فهي ضرورية لعملية إعادة التدوير المعروفة بدورة الكربون الكونية. ومن الممكن يوماً ما أن تُسخَّر هذه الأنزيمات الجرثومية لتحويل المخلفات النباتية، كمخلفات الذرة، والقش، والحشائش، إلى وقود ومركبات كربون بسيطة تستخدم في تصنيع وسائط كيميائية ودوائية، مما يؤدي إلى تخفيض اعتمادنا على الكربون المستخرج من البترول.

استخدمت عمليات التخمير من أجل إنتاج البيرة، وصناعة الخبز وإنتاج الكحول منذ فجر التاريخ. لكن الإدخال الواسع الانتشار لتكنولوجيا التخمير خلال الستينيات من القرن الماضي وحلول الهندسة الوراثية بعد عقدين من الزمن هما اللذان كانا وراء التوسع المستحدث في صناعة الأنزيمات. إن الكائنات المجهرية المأشوبة Recombinant microorganisms هي الآن المصدر السائد للأنزيمات اللازمة في استعمالات (تطبيقات) متنوعة وكثيرة. ومن المرجّح أن هذا التوجه سيتعاظم مستقبلاً، وذلك بسبب سهولة التلاعب الجيني Genetic manipulation وتنوع الأنزيمات المتوفرة من خلال الكائنات المجهرية الموجودة في بيئات متفاوتة ومتطرفة. إن إنتاج

الأنزيمات هو مثال عمّا اصطلح على تسميته بـــ "التقانة الحيوية البيضاء" التي ترمز إلى استعمال وسائل موجودة في الطبيعة في عمليات صناعية متنوعة. تختلف التقانة الحيوية البيضاء عن تطبيقات التقانة الحيوية الحمراء (الطبية) والخضراء (الزراعية)، فهي تمتلك تأثيرات إيجابية في كلٍّ من البيئة والاقتصاد من خلال تعزيز فعالية استخدام الطاقة، وتخفيض استهلاك المواد الأولية وانبعاثات ثاني أوكسيد الكربون بشكل ملحوظ، بالإضافة إلى تخفيض كلف الإنتاج عادةً.

1.1.20 السوق العالمية للأنزيمات Global market for enzymes

لقد نمت الإيرادات العالمية من الأنزيمات الصناعية خلال العقود الخمسة الماضية لتصل إلى أكثر من 2 بليون دولار أمريكي، ومن المتوقع أن تتجاوز 3 بليون دولار أمريكي بحلول العام 2008. كما ازداد حجم الأنزيمات المنتجة بنسبة 12% سنوياً خلال السنوات العشر الماضية. وهناك تقريباً 400 شركة منخرطة حالياً في تصنيع الأنزيمات؛ منها شركات نوفوزايم (الدنيمارك)، ودانيسكو/جينينكور (الدنيمارك والولايات المتحدة الأمريكية)، و BASF (ألمانيا)، و DSM (هولندا) أكبر مصنعي الأنزيمات في العالم حيث تصل إيراداتها مجتمعة من هذه الصناعة إلى 73% من الإيراد العالمي الإجمالي (الشكل 1.20). يجري إنتاج ستين في المئة من الأنزيمات في أوروبا، و15% في الولايات المتحدة الأمريكية و15% في اليابان. ولكن، تستهلك كل من الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا 30% من إنتاج العالم.

يقسم سوق الأنزيمات إلى ثلاثة أقسام: التقني، والمتعلق بالغذاء، والمتعلق بالعلف الحيواني:

- 63% تقريباً من الأنزيمات المباعة معدة لاستعمالات تقنية تتضمن المنظفات، والأقمشة، والجلود، وعجينة الورق والورق، والوقود.
- وتمثل أنزيمات الغذاء ثاني أكبر فئة من سوق الأنزيمات، فهي تشكل 31% من حجم المبيعات الإجمالي.
- أما أنزيمات علف الحيوانات فتمثل قطاعاً صغيراً (6%)، لكنه سريع النمو في سوق الأنزيمات.

2.20 تطوير السلالات المنتجة Development of produces strains

1.2.20 الغربلة من تنوع الطبيعة Screening from nature's diversity

إن تنوع الكائنات المجهرية في الطبيعة هائلٌ، لكن عدداً قليلاً فقط من هذه الكائنات هو الذي يُنتج أنزيمات موافقة تماماً لاستخدامات محددة. لذلك يكمن التحدي في تعيين الأنزيم الأفضل لكل استعمال من بين الأنزيمات الوفيرة التي يقدمها التنوع الحيوي على كوكبنا. تبدأ الغربلة (البحث) نموذجياً باختبار آلاف العيّنات من الكائنات المجهرية التي تمّ جمعها من بيئات طبيعية أو من مجموعات زرع متنوعة، وذلك من أجل تعيين تلك الأنزيمات التي تؤدي فعالية التحفيز المرغوبة تحت الشروط المطلوبة في الاستعمال المقصود. ولهذه الغاية من الضروري تطوير معايرة مناسبة للأنزيم المعني بالاستعمال المقصود. مثلاً، قد يكون أنزيم البروتييز protease الملائم للاستخدام مع مواد تنظيف الغسيل على درجات حرارة منخفضة، أنزيماً يمتلك عدداً كبيراً من التحولات في ظروف قلوية، وعند درجات حرارة تتراوح بين 5 إلى 10 درجات مئوية، وبوجود إضافات متنوعة من المنظفات. وبالتالي، فإن غربلة (البحث عن) مثل هذا الأنزيم قد يتطلب معايرة تقيس حجم إزالة البروتين عن الأقمشة الملوثة بها عند كلٍّ من درجات الحرارة المنخفضة، والرقم الهيدروجيني pH العالي وبوجود المنظفات الكيميائية وذلك على مدى فترة زمن دورة الغسيل. نموذجياً، تضم علبة الأدوات المستخدمة في غربلة الأنزيمات ما يلي:

- *مجموعات الزرع*: تحتفظ شركات الأنزيم عادة بمجموعات كبيرة من الكائنات المجهرية التي جري تجميعها من أماكن متنوعة من حيث المناخ والبيئة.
- *تقنيات الإخصاب*: لمعرفة الفعاليات النوعية للأنزيم الموجود في الطبيعة، فإنه يطبق مبدأ الانتقاء الطبيعي على مقياس دقيق. حيث يستعمل الباحثون شروط زرع مضبوطة من ناحية المغذيات، ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني pH لتحفيز نمو صنف محدد من الكائنات المجهرية. قد تتضمن تقنية الإخصاب تلقيح (Inoculating) هذه المزارع الانتقائية بمجتمع خليط من الكائنات (مثلاً

عيّنة من التربة)، والتحقق من الفعالية الأنزيمية السائدة والكائنات المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات التي تمتلك هذه الفعالية.

- *تقنية المعايرة*: يفيد مثل شائع في الصناعة "إن ما تحصل عليه هو ما تبحث عنه"، لذلك فإن امتلاك واستعمال معايرات مناسبة هو أمرٌ أساسي لإيجاد الأفضل من بين الأنزيمات المرشَّحة. وهذا يتطلب معرفة وثيقة بالمادة الأولية للأنزيم، ومعايير التفاعل (درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني وزمن التفاعل) وما هو مفضل لدى الزبون.

- *مكتبات الجينات*: تولّد شركات إنتاج الأنزيمات مجموعات متنوعة من مكتبات الـــ DNA الجاهزة للغربلة و/أو مكتبات الـــ DNA المتمم cDNA المؤلفة من كائنات مجهرية. عادة ما تُدْخل الجينات الممثَّلة في هذه المكتبات داخل كائنات مجهرية مضيفة بديلة Surrogate host microorganisms مسهلةً التلاعب فيها مخبرياً (كالخميرة*Saccharomyces cereviciae* ، والبكتيريا القولونية الإشريكية Escherichia coli)، ثم يجري بعد ذلك غربلة الكائنات الناتجة المتحولة بحثاً عن تلك التي تمتلك الفعالية الأنزيمية المنشودة. وترجع هذه العملية إلى ما يسمى بكلْوَنة التعبير *(Expression cloning)*.

- *الأتمتة، والروبوتيات، وجمع البيانات*: في حال أجريت بطريقة يديوية، فإن غربلة آلاف العيّنات من المزارع لأنزيمات محددة يشكل مهمة شاقة تنطوي على تكرار لا ينتهي لمهام عرضة للخطأ البشري. لذلك فإن التنفيذ الأفضل لهذا النوع من العمل هو باستخدام الروبوتات المخبرية المبرمجة لتقوم بسحبٍ متكرر لأحجام محددة من السوائل وتنفيذ معايرات كيميائية حيوية بطريقة مؤتمتة، بالإضافة إلى جمع البيانات وتحليلها باستخدام برمجيات معقدة (انظر الفصل الثاني عشر).

- *الغربلة الجزيئية*: يمكن غربلة عيّنات الـــDNA من مكتبات جينية، أو كائنات معزولة، أو عينات من المجال (متاحة) بغية تحديد تسلسلات

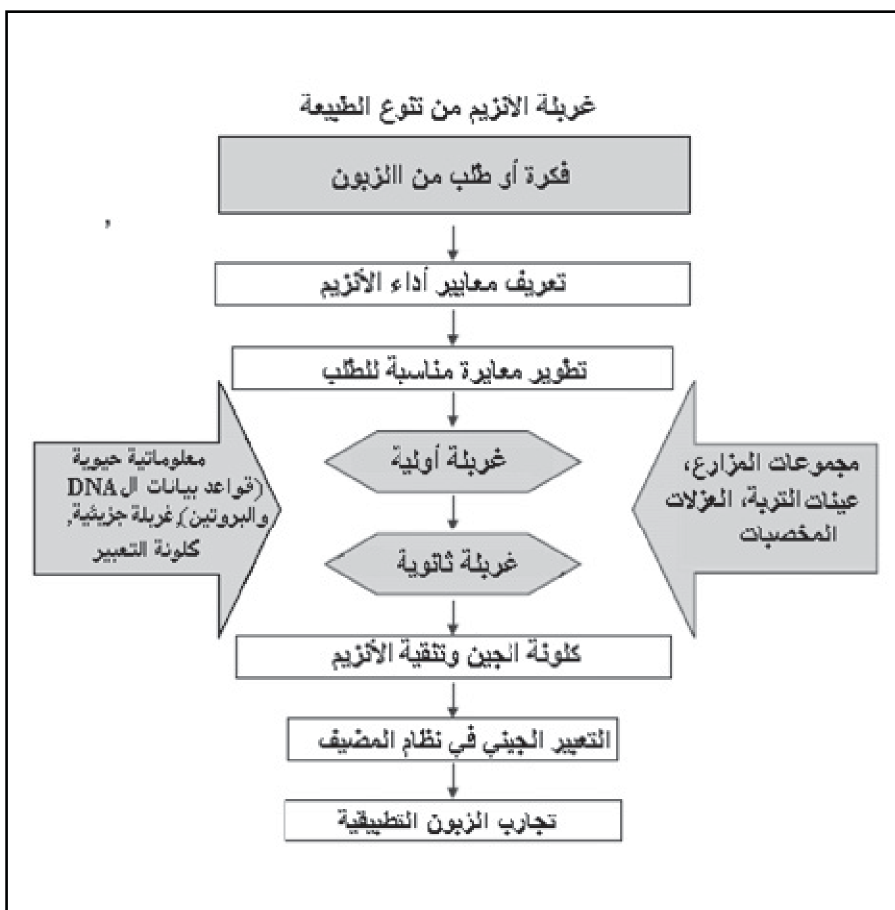
نيوكليوتيدية تُشْفِر لأنزيماتٍ محددةً، وذلك باستخدام تقنيات جزيئية مثل تفاعل البوليميراز التسلسلي(Polymerase chain reaction (PCR أو تهجين الـــ DNA hybridization، بشكل مستقل عن المعايرات الوظيفية.

- *سَلسَلة الجينوم والمعلوماتية الحيوية*: لقد تم وضع الترتيب التسلسلي الكامل لجينوم للعديد من البكتيريا والفطور، كما يجري في كل عام استكمال المزيد منها. معظم هذه التسلسلات متوفرة للعامة، ولكن عدداً قليلاً منها يحفظ كمعلومات تعود ملكيتها للشركات التي أنتجتها. يمكن لبيانات اللتسلسل الجينومي أن تزودنا بمخزون غني لاكتشاف أنزيمات جديدة عن طريق استخدام حسابات الحاسوب للتعرف على الجينات المطابقة و/أو على قطاعات الفاعلية في البروتينات التي تُشفِر هذه الجينات لها .

غالباً ما تقسم مقاربات الغربلة إلى طورين، اصطلح عليهما بالغربلة الأولية والغربلة الثانوية (الشكل 2.20). تنطوي *الغربلة الأولية* على جولة سريعة من الإقصاء، حيث تُفرز الكائنات القادرة على إنتاج الأنزيم المطلوب عن تلك غير القادرة. كما يجري عادةً في هذه الخطوة اختبار آلاف الكائنات من الناحية العملية، باستخدام معايرات بسيطة، سريعة وروبوتية. أما في *الغربلة الثانوية* فتخضع الكائنات التي تم اختيارها في مرحلة الغربلة الأولية إلى عملية إقصاء دقيقة وصارمة. في هذا الطور، تُختَبر الأنزيمات الجرثومية تحت ظروف اختبار قاسية تتعلق بالاستعمال المنشود، وذلك باستخدام تقنيات معايرة طُوِّرت خصيصاً لهذا الغرض. غالباً ما يتم تنقية الأنزيمات التي تبدي أداءً جيداً حيث تُختبر ضمن نماذج مصغرة من التطبيق الحقيقي (انظر الفصل الثاني عشر).

يجري عادةً كلونة الجينات التي تُشفِر لأفضل الأنزيمات المرشَّحة والتعبير عنها داخل واحد أو أكثر من مضيفي (Hosts) التعبير وذلك من أجل إنتاج كميات كافية من الأنزيمات وتوصيفها بصورة شاملة، بما في ذلك تزويد الزبون بعيّنات من الأنزيم من أجل اختباره تحت ظروف العمل الحقيقية. وكجزء روتيني من هذه العملية، يجري تحديد التسلسل النيوكليوتيدي الكامل للجينات المُكَلْوَنة. مما يعطي

معلومات قيمة لفهم البنى والوظائف المحددة لهذه الأنزيمات، كما يسمح بتصنيفها ومقارنتها بأنزيمات مشابهة. وفي حال الرغبة بوجود تنوع طبيعي أكبر، فإنه يمكن كَلْوَنَة هذه الجينات بشكلٍ سريع عن طريق استغلال المعلومات المستقاة من سلسلة الـــ DNA إضافة إلى المقاربات التي تعتمد تقنيات الوراثة الجزيئية. ولا تعتبر غربلة الأنزيمات مكتملةً إلا إذا تم تزويد الزبائن بأنزيمات جرى اختيارها بحرص ليقوموا بدورهم بتقييم أدائها في تطبيقاتهم، مما يضمن تسليم الزبائن المنتج الصحيح المناسب لحاجاتهم.



الشكل 2.20: مخطط انسيابي يصوِّر الخطة الشاملة لعملية غربلة الأنزيم غربلة أنزيمية من تنوع طبيعي.

2.2.20 الهندسة الوراثية لسلالات الإنتاج

Genetic engineering of production strains

لا يهم كيفية اكتشاف أنزيم ما، إلا أنه يجب أن يكون إنتاجه بكميات قابلة للتطبيق اقتصادياً وبدرجة نقاوة عالية. ففي بعض الأحيان من المطلوب إنتاج الأنزيم بكميات أعلى بألف مرة من تلك التي تم الحصول عليها من المصدر الأصلي. وأفضل طريق لمواجهة مثل هذه التحديات هو استخدام التقانات الجينية. لذلك، طورت شركات الأنزيمات عدة أنواع من البكتيريا، والخميرة، والفطور الخيطية الآمنة والصديقة للبيئة التي تعمل كعوائل مسؤولة عن تصنيع منتجات هذه الشركات من الأنزيم. وبذلك يتم ادخال الجين الذي يرمز إلى أنزيم محدد إلى المادة الوراثية لهذه العوائل بحيث يمكن الحفاظ عليها بشكل مستقر، ونسخها وترجمتها كما لو كانت أحد المكونات الأصلية لخلية الإنتاج. من الضروري أن تكون الخلايا المضيفة خالية تماماً من أية فعاليات جانبية غير مرغوبة، مثل فعالية أنزيمات البروتيياز، التي يمكن أن تكون مؤذية للأنزيمات المنتجة. وإذا كانت الفعالية و/أو الثباتية الأنزيمية تتطلب حصول تعديلات ما بعد مرحلة الترجمة، فمن المهم اختيار مضيف إنتاج لهذه الأنزيمات يمتلك آليات خلوية بإمكانها تعديل البروتين بحيث تكون خصائصه مشابهة لتلك التي يمتلكها الأنزيم المنتج من قبل مصدر إنتاجه الأصلي. لقد جرى تطوير وتحسين الكائنات المستخدمة في عمليات التخمير الأنزيمية الواسعة النطاق على مدى سنوات عديدة وذلك من خلال التطفير والاستيلاد الانتقائيْن. فعلياً لقد استُخدمت جميع أنواع الكائنات الموظفة لإنتاج الأنزيمات، في عمليات إنتاج صناعية لأكثر من 20 عاماً، وبناء عليه، اكتسبت الشركات التي تستخدمها معرفة كبيرة حول التخمير وأدوات الهندسة الوراثية. تقوم هذه الكائنات المضيفة المختارة بإفراز منتجاتها من الأنزيمات الصناعية إلى الوسط المغذي، خلا استثناءات قليلة، مما يتيح امكانية الاسترجاع السريع لهذه الأنزيمات مع أقل عمليات تنقية لازمة. أخيراً، من المهم جداً امتلاك الكائنات المضيفة تاريخاً من الاستخدام الآمن. وهناك جمعية مصنعي ومصيغي منتجات الأنزيمات The Assosiation of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMEEP), www.amfep.org وهي منظمة صناعية تقدم إرشادات في انتقاء

الخلايا المضيفة ومواضيع أخرى عديدة في الصحة والسلامة البيئية ذات العلاقة بتصنيع الأنزيمات.

3.2.20 الكائنات المضيفة المستخدمة عادةً

Commonly used host organisms

إن القدرة على الإدلاء عن الأنزيمات التابعة لأيّ صنف، ومن أيّ مصدرٍ كان هو أمر أساسي من أجل إطلاق الإمكانات العملية التي توفرها الأنزيمات للصناعة. ومع اعترافها بأن هذا هدف بعيد المنال، توظف شركات إنتاج الأنزيمات كائنات مضيفة متعددة لتقدمَها كبدائل عن العطاءات العالية من الأنزيم. وكقاعدة عامةلاختيار المضيف المناسب هي أن عادة ما يتم الحصول على أفضل النتائج عن طريق اختيار مضيف متصل عرقياً بالكائن الذي أنتج الأنزيم أصلاً. وبصيغةٍ أخرى، إن أفضل إنتاج للأنزيمات الفطرية يكون بواسطة مضيف من سلالات الفطور، وأفضل إنتاج للأنزيمات البكتيرية يكون بواسطة مضيف من البكتيريا، وهكذا (انظر الجدول 1.20). بشكل عام، تُستخدم أنواع بكتيرية من جنس *Bacillus* لإنتاج أنزيمات بكتيرية تُستخدم خارج الخلية مثل أنزيمات البروتياز وأنزيمات الأميلاز، في حين تُستغل أنواع تابعة للجنس *Streptomyces* بشكل أساسي من أجل إنتاج أنزيم أيزوميراز الغلوكوز Glucose isomerise ، وهو أنزيم مهيأ لإنتاج شراب الذرة العالي التركيز من الفركتوز. وأكثر أنواع الفطور المضيفة لإنتاج الأنزيمات الفطرية هي الأنواع التابعة للجنسين *Aspergillus*و*Trichoderma*، وذلك بسبب مقدرتهما على إفراز مستويات عالية من الأنزيمات إضافةً إلى تاريخهما الطويل من الاستخدام الآمن. وقد جرى حديثاً تطوير مضيف فطريٍ جديدٍ هو *Fusarium venenatum*، المدين بتاريخه الطويل من الاستخدام الآمن كبديل عن اللحم في الاستهلاك البشري. وكذلك تُستخدم بعض أنواع الخميرة (مثلاً *Saccharomyces cervisiae*، *Kluyveromyces lactis*) من أجل إنتاج أنزيمات نوعية، ولو بوتيرةٍ أقل من البكتيريا والفطور الخيطية .

4.2.20 النواقل التعبيرية Expression vectors

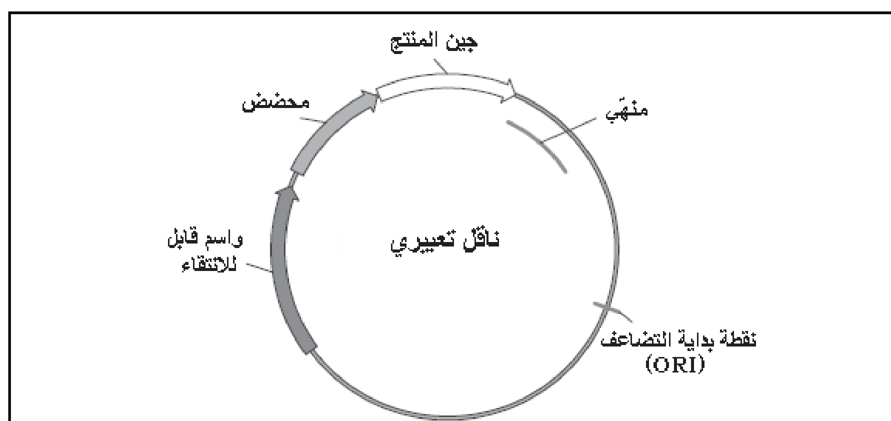
إضافة إلى توفر سلالة مضيفة ملائمة لإنتاج الأنزيم، كذلك فإن توفر الناقل التعبيري المُحسَّن مطلوبٌ للحصول على سلالة منتجة مثلى. إن معظم النواقل التعبيرية للجينات هي بلازميدات، أو أجزاء DNA من بلازميدات يجري دمجها ضمن جينوم الكائن المضيف إما بنسخة واحدة أو بنسخ متعددة. من حيث المبدأ، يَضُمُ الناقل التعبيري "واسم انتقاء" selection marker (وهو جين يمكِّن المرء من إدخال الناقل المعبر إلى داخل خلية المضيف والحفاظ عليها)، وكاسيت تعبير تُشفر إلى جين الأنزيم المرغوب، ومنطقة جينية (في حالة النواقل البكتيرية) تتيح تكاثر الناقل في مضيف بديل أو وسيط مثل بكتيريا الإشريكية القلولونية .E. Coli كما تضم مجموعة التعبير الجيني هذه محضضاً promoter قوياً ليوجه عملية نسخ الجين التي ترمز إلى الأنزيم المختار ومنهّي (قاطع) نسخ (Transcriptional terminator) (الشكل 3.20). وتعود فعالية الناقل التعبيري بشكلٍ كبير إلى كمية الـــ RNA الرسول mRNA المنتجة من خلال التبادل المعقد بين المحضض، والجين البنائي وسلالة الكائن المضيف.

وحين يكتمل تجميع الناقل التعبيري الذي يأوي جين الأنزيم، يتم نقله إلى السلالة المضيفة عن طريق عملية التحويل *(Transformation)*. في هذه العملية يتم معالجة خلايا المضيف إما كيميائياً أو أنزيمياً لجعل جدرانها منفذة للناقل التعبيري من الـــDNA . بعد تحضينها بوجود الناقل التعبيري، يُسمح للخلايا بتجديد (ترميم) جدرانها ثم توضع على وسط نمو انتقائي يسمح فقط بنمو الخلايا التي أدخلت الناقل التعبيري مع واسمه الانتقائي الذي يؤمن لها التكاثر المستقر. عندئذ يمكن اختبار مقدرة تلك المتحولات (Transformants) الناتجة من إنتاج الأنزيم المأشوب. تُنمّى المتحوِّلات بشكلٍ فردي في مزارع صغيرة (انظر الفصل الثاني عشر) من أجل تمييز السلالات ذات المستوى الأعلى من التعبير الجيني حيث تُقاس عطاءات المنتج. وفي النهاية تُقيَّم المتحولات على أساس عطاءات التخمير، إلا أن هناك معايير إضافية يمكن أيضاً أخذها بعين الاعتبار كالشكل الظاهري للخلايا المتحولة.

الجدول 1.20: عوائل انتاج بكتيرية وفطرية مستخدمة بشكلٍ شائع في بعض المنتجات الأنزيمية وتطبيقاتها (استعمالاتها)

الفعالية الأنزيمية	التطبيق/الصناعة	الكائن المضيف	الكائن المانح
أسيتو لاكتات ديكاربوكسيلاز	البيرة	*Bacillus subtilis*	أنواع *Bacillus*
أميلاز (فطري)	الخبز، البيرة، والنشاء	*Aspergillus oryzae, A.niger*	أنواع *Aspegillus*
أميلاز (بكتيري)	النشاء	*Bacillus amyloliquefaciens licheniformis subtilis*	أنواع *Bacillus* و *Thermoactinomyces*
سيلولاز	الخبز، البيرة، المنظفات، والأقمشة	*Trichoderma reecei, T. longibrachiatum*	أنواع *Trichoderma, Aspergillus, Humicola,* و *Thielavia*
غلوكوأميلاز غلوكوز أيزوميراز	النشاء النشاء (شراب ذرة عالي الفركتوز)	*Aspergillus niger, A. Awamori Sterptomyces lividans, S. Murinus, S. rubiginosus*	أنواع *Aspergillus niger,* و *Streptomyces Actinoplanes*
اللبياز	الخبز، مشتقات الحليب، الدهون والزيوت	*Aspergillus oryzae, A. niger*	أنواع *Thermomyces, Candida, Fusarium* و *Rhizomucor*
لياز البيكتات Pectate lyase	الفواكه والخضار، والأقمشة	*Bacillus licheniformis*	أنواع *Bacillus*
البيكتيناز، متعدد الغالاكتويوريناز	الفواكه والخضار، والمشروبات	أنواع *Aspergillus*، *Penicillium* و *Trichoderma*	أنواع *Aspergillus*
أستراز البيكتين	الفواكه والخضار، والمشروبات	*Aspergillus Oryzae , A. niger*	أنواع *Aspergillus*

الفايتاز	علف الحيوانات	*Aspergillus Oryzae , A. niger*	أنواع *Aspergillus, Thermomyces* و*peniophora*
البروتياز (قلوي)	المنظفات	*Bacillus subtilis, B. Licheniformis, B. clausii*	أنواع *Bacillus*
البروتياز (حمضي)	مشتقات الحليب (تخثر الحليب)	*Aspergillus Oryzae , A. Niger, A. awamori*	معدة العجل، وأنواع *Mucor*، و*Rhizomucor* *Cryphonectria*
بولولناز	النشاء	*Bacillus subtilis, B. Licheniformis*	أنواع *Bacillus*
كزايليناز (هيمي سيليولاز)	عجينة الورق الورق، والأقمشة	*Aspergillus niger, Bacillus subtilis, B. Licheniformis, Trichoderm reesei*	أنواع *Actinomadura, Trichoderma* و *Bacillus*



الشكل 3.20: بنية الناقل التعبيري العامة لإنتاج الأنزيمات الصناعية. يُستخدم فيه محضض قوي مأخوذ من مضيف الانتاج لتوجيه نسخ الجين، وجين واسم قابل للانتقاء من أجل انتقاء الخلايا المتحوّلة التي تأوي الناقل التعبيري.

5.2.20 السلالات المُحسَّنة لإنتاج الأنزيم

Improved enzyme production strains

عندما يتم اختيار المتحوِّل الأمثل كما وُضِّح في الفقرة السابقة، سيكون ممكناً تحسين المعيار تركيز انتاج الأنزيم ومواصفات أخرى في سلالة الانتاج عن طريق

تطبيق أساليب التطفير الكلاسيكية على المتحوّل. في هذه العملية يخْضَع الكائن المُتحوّل إلى معالجات بغرض إحداث تغيرات عشوائية في جينومه. بعد ذلك يتم غربلة حصيلة مجتمع الخلايا الطافرة بحثاً عن تلك التي تبدي زيادة في العطاء، أو أي صفات محسنة أخرى، وذلك بنفس الطريقة التي جرى فيها غربلة المتحوّلات أساساً. إن ابتكار سلالات إنتاج محسّنة أمر مرغوب جداً لأنه يحسن اقتصادية الأنزيم بشكل عام (عطاء من الأنزيم أعلى ما يعني كلفة أقل على المنتِج وعلى الزبون). فالكلفة الأقل لإنتاج الأنزيم يمكن أن تسمح باستخدامه في تطبيقات جديدة كانت كلفتها قبل ذلك مرتفعة جداً. بالإضافة إلى أن زيادة العطاء من الأنزيم تعني الحاجة إلى طاقة إنتاجية أقل، وهذا يقود إلى تحرير المخمرات من أجل منتجات أخرى.

6.2.20 بديل لتقانة الحمض النووي DNA

An alternative to DNA technology

في حال المنتجات الأنزيمية متعددة المكونات كأنزيمات السيلليولاز والبيكتيناز حيث يعتمد أداء المنتَج على فعالية العديد من الأنزيمات، فإنه من غير السهل دائماً اللجوء إلى تقانة الحمض النووي DNA المأشوب للحصول على سلالات عالية العطاء، لأن المنتج النهائي يجب أن يحتوي على نسب محددة لعدد من بروتينات الأنزيمات. كما أنه في حالة المنتجات الأخرى، فالزبائن لا ترغب باستخدام تقانة الحمض النووي DNA المأشوب، وذلك بسبب قلق عامة الشعب من استخدام الكائنات المعدلة وراثياً (genetically modified organisms (GMOs)). لذلك في هذه الحالات، وعندما تدعو الحاجة إلى المزيد من تحسين أداء سلالة الإنتاج المأشوب، فإن الطرائق التقليدية في تحسين السلالات قد تكون هي الحل. إن لطرائق تحسين السلالات التقليدية من خلال التطفير والاستيلاد تاريخَ استخدام طويلاً. وما إنتاج أنزيم الأميلاز من قبل فطر العفن الأسود (*Aspergillus niger*) وإنتاج السيلليولاز من قبل فطر *Trichoderma reesei* إلا أمثلة على قوة هذه الطرائق. إن غربلة سلالات محسنة هو أشبه بغربلة أنزيمات جديدة موجودة في عيّنات طبيعية في أنها تتألف من غربلة (بحث) أولية عالي الأهلية، وبذلك 10000 إلى 100000 طافر يمكن اختباره باستخدام معايرات

روبوتية ومؤتمتة، ثم يليها غربلة ثانوية، حيث يعاد اختبار الإصابات الناجحة (أي تلك التي تم فيها التطفير المطلوب) المتحصل عليها من الغربلة الأولية (مثلاً 50 إلى 500 طافر) للكشف عن أي تحسن طرأ على إنتاجية الأنزيم. في النهاية، تُحلّل مجموعة أصغر من الطافرات المختارة في الغربلة الثانوية في عمليات تخمير على مستوى مخبري، وذلك من أجل اختيار المرشحين الأفضل من هذه الطافرات لإجراء المزيد من عمليات الأمثلة عليها.

7.2.20 هندسة البروتين وتطوره الموجه

Protein engineering and directed evolution

تشكّل الأنزيمات المتواجدة طبيعياً الأساس لكل منتجات الأنزيمات الصناعية، ولكن يمكن بواسطة الطرق الجديدة لتصميم الأنزيمات والتطور الجزيئي الموجه، تحسين الأنزيمات بحيث تحقق أي متطلبات يمكن أن تكون لدى الزبون. إن الباحثين قادرون من خلال جمعهم للأنزيمات والكائنات المجهرية من جميع أنحاء العالم، على إيجاد حلولٍ أنزيمية للعديد من المشاكل الصناعية. ولكن، في بعض الأحيان، حتى الطبيعة تكون غير قادرة على مجاراة المتطلبات البالغة في استخدامات الأنزيم التجارية الحديثة. كما أنه قد تكون درجات الحرارة العالية، والقيم المتطرفة للرقم الهيدروجيني pH ، والكيماويات الجالفة المستخدمة حالياً في العمليات الصناعية غير مناسبة للأنزيمات الطبيعية التي يمكن أن تستخدم في الصناعة. إلا أنه و عن طريق توظيف استراتيجيات هندسة البروتين، فإنه من الممكن تجاوز هذه الصعوبات. لقد طور منتجو الأنزيمات والمختبرات الأكاديمية بالتعاون فيما بينهم تقانات مبينة في الفصول المقبلة من هذا الكتاب يمكن استخدامها لتحسين مواصفات أداء الأنزيمات وذلك عن طريق تعديل الجينات التي تشفّر لها.

8.2.20 تصميم البروتين المنطقي: هندسة البروتين

Rational protein design: protein engineering

تستوجب هندسة البروتين الاستبدال الانتقائي لأحماض أمينية معينة ضمن البروتين لإجراء التعديل المقصود على خصائص كيميائية حيوية محددة لهذا البروتين كالثباتية الحرارية، أو الرقم الهيروجيني الأمثل، أو النوعية تجاه المادة

الأولية. عملياً، تستخدم هذه التقانة التطفير الموجّه في الموقع site-directed mutagenesis في عملية تعديل الجين الذي يُشفّر للبروتين. تجرى مهام هندسة البروتينات في أغلب الأحيان باستخدام نموذج تفصيلي ثلاثي الأبعاد لبنية البروتين الذي تم توليده من خلال أنماط انحراف الأشعة السينية لعيّنات متبلورة من البروتين. واعتماداً على سنوات من الأبحاث في تقصي العلاقة بين بنية الأنزيمات ووظيفتها، جرى تطوير برمجيات تنبؤية معقدة لنمذجة البروتينات التي تساعد مهندسي البروتينات في اقتراح الاستبدلات في الأحماض الأمينية للبروتين. ومن الممكن مقارنة بنية أنزيم ما بأنزيمات أخرى ذات بنية ثلاثية الأبعاد مشابهة له، ولكنها تختلف عنه في خصائصها، وذلك بحثاً عن مفاتيح تقود إلى تحديد الأحماض الأمينية المسؤولة عن صفاته المميزة. إضافة إلى ذلك، يمكن استخدام استراتيجيات مشابهة حتى بدون وجود أي معرفة لبنية الأنزيم وذلك بواسطة اصطفاف تسلسل الأحماض الأمينية. كما يمكن لمقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية الأساسية ضمن عائلات من الأنزيمات وثيقة الصلة ببعضها البعض، لكن ذات خصائص وظيفية مختلفة، أن تعطي أدلة هامة للتعرف على ثمالات الأحماض الأمينية المسؤولة عن مهمة الأنزيمات التحفيزية والديناميكا حرارية الفردية.

9.2.20 التطفير العشوائي والتطور الموجّه

Random mutagenesis and directed evolution

في العديد من الحالات، يحفز الأنزيم الفريد الذي تم عزله، التفاعل المنشود، لكنه يخفق في ذلك عند استعماله في الصناعة وذلك بسبب عدم الملاءمة إما في الرقم الهيدروجيني الأمثل ، أو سيماء الحرارة أو لحساسيته تجاه الكيماويات (مثل مكونات المنظفات) الموجودة. لذلك في هذه الحالات، تتم هندسة الأنزيم باستخدام الطريقة الحديثة نسبياً من التطور الموجه Direted evolution. تحاكي هذه الطريقة عملية التطور الطبيعي في أنها تتضمن طفرة جينية، وانتقاء، وتأشيب، لكنها تقتصر على جين محدد، كما يجري الاختبار في أنبوب بدلاً من الكائن الحي. في البداية، يجري تطفير عشوائي للجين الذي يُشفر للأنزيم المستهدف، وذلك عن طريق صنع نسخ من

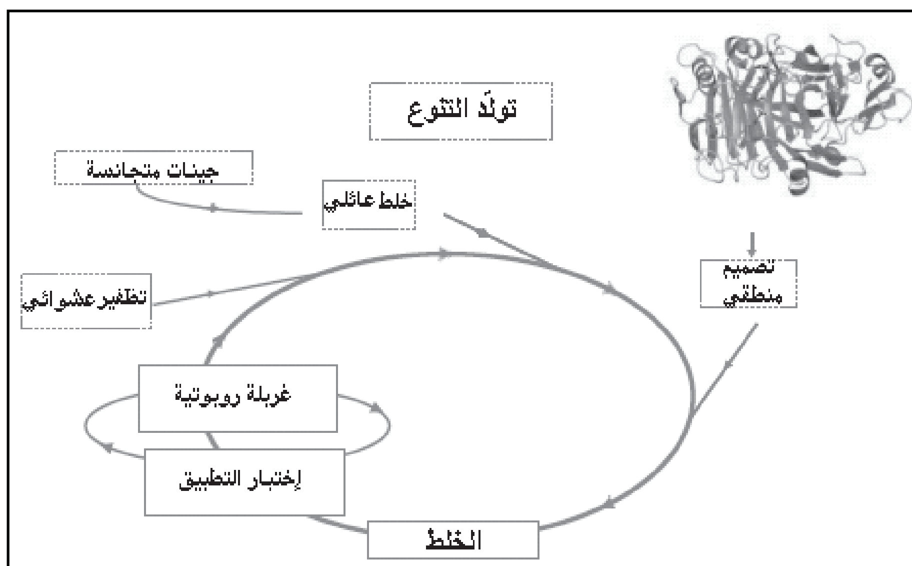
الجين تحت شروط تدخل أخطاء على امتداد التسلسل النيوكليوتيدي. بعد ذلك تُكلوَن الجينات الطافرة ضمن بلازميدات، ثم تحوّل في مضيف تعبير أحادي الخلية (عادة ما يكون خميرة، أو بكتيريا الإشريكية القولونية *E. coli* أو أنواع *Bacillus*) حيث تستقبل كل خلية نسخة واحدة من الجين المطفَّر. يلي ذلك غربلة الخلايا المتحوّلة بحثاً عن تحسُّن في الوظيفة وذلك باستخدام معايرة عالية الأداء (أي يمكن معالجة بيانات كثيرة في وقتٍ يسير High throughput assay) كما هو مذكور في الفقرة 3.20، وهكذا يتم التعرف على تلك الخلايا المعبِّرة عن الأنزيمات المحسنة. في معظم الأحيان، تحدد جولة واحدة من التطفير أشكالاً من الأنزيمات التي طرأ عليها تحسن طفيف فقط، لذلك يجري عزل الجينات التي تشفر لهذه الأنزيمات المحسنة، ويطبق عليها دورات متكررة من التطفير والغربلة. ليس مدهشاً أن دورات متكررة من التطفير تؤدي إلى تراكم أكثر فأكثر للطفرات، ولكن بما أن احتمال ادخال طفرات تؤثر سلباً في أداء الأنزيم أكبر بكثير من تلك التي تحسن أداؤه، فإنه غالباً ما يصعب الوصول إلى المستوى المنشود من التحسين في أداء الأنزيم من خلال التطفير العشوائي فقط. لذلك، ولتجنب هذه المعضلة، يستخدم الباحثون الآن تأشيباً بين جينات الأنزيم المحسنة من أجل ابتكار مكتبات جينية تحتوي على جينات مندمجة مع طفرات وجدت سابقاً في جينات معزولة منفردة. يمكن تنفيذ هذا التأشيب في الزجاج باستخدام تقنيات متنوعة تدعى *مناولة الحمض النووي DNA shuffling* (الشكل 4.20) أو مباشرة في الخميرة باستخدام نظامها الطبيعي للتاشيب المتماثل. يزيد خلط الـــ DNA بشكل مثير السرعة التي يمكن من خلالها توليد أنزيمات محسنة، وذلك كونه يزيد نسبة الأشكال المحسنة من الأنزيم مقارنةً بالدورات المتتابعة من التطفير العشوائي .

عندما تتوفر عائلة من الأنزيمات المرتبطة ببعضها البعض، يمكن استخدام تقنية تعرف *بالخلط (أو مناولة) العائلي family shuffling* (الشكل 4.20). في هذه التقنية يمكن استبدال تنوع الجينات الذي أدخله التطفير العشوائي بالتنوع المتأصل في الجينات المتواجدة طبيعياً. كما أنه في طرق الخلط العائلي، تنفذ خطوة التأشيب مباشرة على الجينات المرتبطة ببعضها البعض (عادة ما تضم تجانساً في تسلسل النيوكليوتيدات بنسبة أعلى من 70%)، مما ينتهي بنسبة أكبر من

المأشوبات الفعالة، وذلك لأن جميع الجينات الداخلة في التأشيب تشفر لأنزيمات فعالة. تطبيقياً، تستخدم كِلتا التقنيتين- هندسة البروتين والتطور الموجه- في نفس الوقت من أجل تحسين الأنزيمات، كما هو موضح في الجدول 2.20.

الجدول 2.20: أمثلة على منتجات أنزيمية ناجمة عن هندسة البروتين

الأنزيم	طريقة التطفير	الميزات
الأميلاز	هندسة البروتينات	انخفاض كالسيوم معزز، وفعالية نوعية
الأميلاز	هندسة البروتينات	ثباتية أكسدة معززة
اللايباز	التطور الموجه	أداء معزز في عملية الغسل الأولى
البروتياز	التطور الموجه	أداء معزز
الفوسفوليباز	التطور الموجه	تعديل في نوعية الأنزيم تجاه المادة الأولية
البيروكسيداز	هندسة البروتين والتطور الموجه	زيادة في الثباتية الحرارية وثباتية الأكسدة

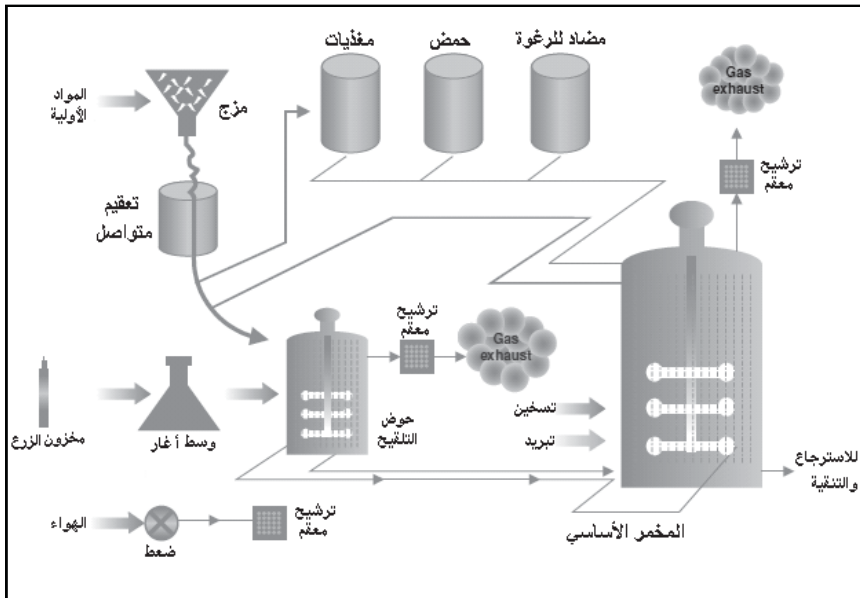


الشكل 4.20: استراتيجيات هندسة البروتين المستخدمة في تحسين الأنزيمات الصناعية.

3.20 عمليات الإنتاج، والاسترجاع والتصييغ (تشكيل المستحضرات) على مستوى ضخم

Large-scale production, recovery and formulation

في العام 1920، قدمت شركة نوفوزايمز (Novozymes) الأنزيم ثيرموزايم (Thermozyme)، أول أنزيم في العالم يُنتَج بواسطة عملية التخمير، وهي بذلك مهدت الطريق لانتاج الأنزيمات على مستوى ضخم. ومنذ ذلك الحين دأب منتجو الأنزيمات على الاستثمار في تقنية التخمير لجني منتجات أرخص مع تسليمٍ أسرع وذلك لمصلحة كلٍّ من الزبائن والمستهلكين على حد سواء. في الوقت الحاضر يجري إنتاج معظم الأنزيمات الصناعية بواسطة عملية التخمير المغمور (Submerged ferementation)، وهي عملية تتضمن زرع سلالات الانتاج في أوعية تخمير مغلقة تحتوي على الوسط المغذي اللازم لنمو الخلايا. ثم لدى أيض المواد المغذية من قِبل الخلايا، يتم تحرير المنتج الأنزيمي في الوسط. أما حجم هذه المخمرات الصناعية فيمكن أن يصل إلى 1000 متر مكعب.



الشكل 5.20: مخطط تخمير الأنزيم الصناعي.

1.3.20 مخطط عملية التخمير Fermentation scheme

يتألف وسط التخمير من مواد مغذية معقمة مستمدة من مواد أولية متجددة مثل نشاء الذرة، وسكر وبروتين الصويا. يجري عادة توظيف ثلاثة أنواع أساسية من استراتيجيات التخمير. تخمير الدفعة، وهو المخطط الأبسط من بروتوكولات برامج التخمير، الذي يسمح بنمو التلقيح، بحيث لا شيء يضاف بعد إضافة الدفعة الأولى من المغذيات.

وعملية تخمير الدفعة المغذاة، التي يتم فيها إضافة المواد المغذية المعقمة إلى المخمر خلال طور نمو الخلايا. وعملية التخمير المستمر، التي تضاف إليها المغذيات المعقمة داخل المخمر بمعدل يساوي ما يتم إزالته من المرق المستهلك في الجهاز، محققة بذلك حالة الاستقرار خلال عملية إنتاج الأنزيم. ويمكن الحفاظ على العملية المستمرة لفترات طويلة من الزمن، فمن الناحية النظرية هذا ممكن إلى الأبد، لكنه عملياً لعدة أسابيع فقط. وللوصول بالأنزيم إلى أعلى تركيز ممكن في هذه العملية فإنه باستطاعتنا مراقبة درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني (درجة حموضة الوسط)، وتركيز الأكجسين المنحل والقيام بضبطهم جميعاً.

بعد انتهاء عملية التخمير، يفصل الأنزيم عن كتلة الخلايا الحيوية وذلك بواسطة الترشيح، والتلبيد (Flocculation) ، والطرد المركزي، أو بالجمع بين هذه الوسائل كلها. ثم بعد استخلاص الأنزيم، يجري تركيزه بواسطة أغشية شبه نفوذة أو بالتبخير. وإذا كان المطلوب الحصول على أنزيم عالي النقاوة، فغالباً ما توظف العملية التي تلي الاستخلاص خطوات خاصة من أجل إزالة الشوائب غير المرغوبة. ينفذ هذا عن طريق تقنيات الترسيب الانتقائي، أو ادمصاص الشوائب، أو البلورة التي يمكن من خلالها الحصول على منتجات أنزيمية فائقة النقاوة. في نهاية المطاف، من الضروري تقديم الأنزيم بشكل مرغوب من قبل الزبون. وهذا قد يتضمن أشكالاً متنوعة من مستحضرات جافة وسائلة للأنزيمات مقيدة الحركة (Immobilised). ويجب ملاحظة أن عمل الأنزيمات سيختلف قليلاً من حيثُ فعاليتُها، ثباتيتُها وأداؤها في الاستخدامات الصناعية المتنوعة وفقاً لتنوع

الأشكال التي تحضر فيها هذه الأنزيمات. ومهما كان الشكل النهائي للمستحضر، فإن المنتجات الأنزيمية يجب أن تحقق ثلاثة متطلبات:

- يجب ان تكون فعالية الأنزيم ثابتة.
- يجب أن يكون الشكل الفيزيائي للمستحضر الأنزيمي متوافقاً مع الاستخدام المُتوخَى له.
- يجب أن يكون المنتج الأنزيمي آمناً للاستخدام.

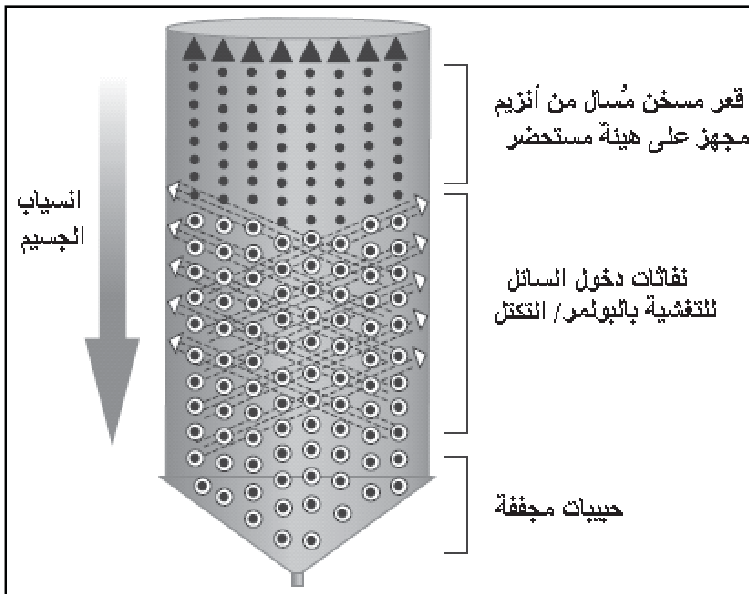
2.3.20 الأشكال السائلة Liquid forms

يفضّل بعض مستخدمي الأنزيمات الصناعية مستحضرات الأنزيمات السائلة، وذلك لأنها سهلة التداول. نموذجياً تشتمل مكّونات هذه المستحضرات على الماء، ومثبتات مثل الغليسيرول، والملح والسكر. كما تتوافر أشكال متطورة من المنتجات السائلة مثل المنتج الأنزيمي الحصري المحضر في كبسولات الذي طّورته شركة نوفوزايمز (Novozymes) مؤخراً ليتمتع بثباتية أفضل وخاصية الاطلاق البطيء.

3.3.20 الأشكال الصلبة Solid forms

عادة ما تكون المنتجات الأنزيمية الصلبة على شكل مساحيق طليقة تتألف من جسيمات ذات أقطار تتراوح بين 0.1 و1 ميليمتر. إن الغبار الناجم عن المستحضرات على شكل مساحيق، غير مرغوب به في بعض الاستعمالات الصناعية، لذلك، ينتج معظم المصنعين منتجات حبيبية ومقيدة الحركة. ليس من المدهش وجود أنواع عديدة من المستحضرات الحبيبية المحضرة من تراكيب ومواد كسوة مختلفة. فمثلاً، تُستخدم جسيمات قليلة الغبار ومقواة من الداخل ومغطاة بمادة شمعية في نطاق واسع من صناعة مساحيق المنظفات. كما أن هناك أشكالاً أخرى من المستحضرات الحبيبية تستخدم في استعمالات أخرى مثل صناعة الخبز، وتحضير مستحضرات الأنزيمات المقيدة الحركة مثل أنزيم أيزوميراز الغلوكوز المستخدم في تحويل سكر الغلوكوز إلى سكر الفروكتوز. من الممكن إعادة استخدام الأنزيمات التي تقيد حركتها على سطوح

صلبة، كما يسهل فصلها عن نواتج تفاعلها. تتوفر العديد من القوالب الداعمة بما فيها المواد الراتنجية resins ، والحباب (الخرز) الزجاجية، والعديد من بوليميرات السيليولوز المعدلة، والجيلاتين، والأغاروز، والكيتوسانات chitosans وعديدات السكر الأخرى. وتتطلب معظم هذه القوالب الداعمة تفعيلاً كيميائياً قبل عملية ربطها بالأنزيم. تشمل الاستخدامات الأخرى للأنزيمات مقيدة الحركة عمليات أسترة عابرة transesterification للشحوم وفصل المركبات الكيرالية chiral. غالباً ما يجري تحضير حبيبات granulate الأنزيمات في أبراج تحبيب السوائل ذات البخاخات العلوية (الشكل 6.20) التي يسمح فيها لقطرات الأنزيم المشكلة مع الملح، والسيليولوز ومكونات أخرى بالسقوط عبر ضباب مسخن من مادة مغطية (واقية) من البوليميرات لتعطي جسيمات متكتلة يبلغ قطرها نحو 0.5 ميليمتر. إن الحبيبات هي طريقة فعالة جداً، وآمنة من أجل إيصال الأنزيمات في شكل خال من الغبار وجاف من أجل استخدام في العديد من التطبيقات.



الشكل 6.20: مخطط توضيحي لجهاز تحبيب بالبخ من الأعلى top-spray granulator الذي يقوم بتكتيل (تجميع) الجسيمات الأدق إلى حبيبات أضخم حرة الانسياب. تجري عملية التحبيب عن طريق بخ السائل ليصبح مسحوقاً مُسيَّلاً. بعد ذلك تجفف الحبيبات بواسطة تيار من الهواء الساخن.

4.20 استعمال الأنزيمات Application of enzymes

بالنظر إلى تعدد الفوائد التي تقدمها الأنزيمات الصناعية فإنه من الطبيعي ازدياد استعمالاتها التجارية سنوياً. تستعرض الفقرات التالية بعضاً من التطبيقات الأساسية لأنزيمات من الأسواق الأساسية الثلاثة: السوق التقني، وسوق الغذاء، وسوق الأعلاف.

1.4.20 أنزيمات العلف الحيواني Animal feed enzymes

هناك العديد من مكونات الأعلاف التي لا يتم هضمها، أو امتصاصها بشكل كامل في أمعاء الماشية، مما يُنقص فعلياً من القيمة الغذائية للعلف، وبالتالي، يُقلِّل من نمو الحيوانات. ولكن، عند إضافة الأنزيمات للعلف يمكن تحسين قابلية انهضامه. إن أنزيمات العلف أدوات أثبتت جدارتها ونجاحها في السماح لمنتجي العلف بتوسيع نطاق المواد الأولية المستخدمة في العلف وتحسين فعالية الخلطات العلفية المتوافرة. هناك نطاق واسع من المستحضرات الأنزيمية متوافرة وتستخدم في تفكيك مواد مثل حمض الفايتك Phytic acid، والسيليولوز، والهيميسيليولوز، والغلوكان، والنشاء، والبروتينات، وعديدات السكر الشبيهة بالبكتين، والزايلان (Xzylan)، والرافينوز (Raffinose)، والستاكيوز (Stachyose). تضاف الأنزيمات إلى العلف، إما مباشرة أو كخليط محضر سابقاً مع الفيتامينات، والمعادن، والإضافات الأخرى. إن الفوائد الرئيسية للعلف المُكمَّل بالأنزيمات تشمل تحقيق نمو أسرع للحيوان، والانتفاع بالنسبة المحوَّلة من العلف (أي استفادة أكبر من العلف)، وإنتاج أكثر انتظاماً وصحة عامة أفضل للحيوان.

يمكن تحسين تربية الخنازير والدواجن بقدرٍ مهم عن طريق إلحاق الأنزيمات إلى غذائها الطبيعي، فالجهاز الهضمي لدى الخنازير لا ينتج أنزيمات قادرة على تحطيم جدران خلايا النباتات. لذلك تُمكّن إضافة الأنزيمات التجارية من تحويل العلف إلى شكل يمكن للحيوان امتصاصه والاستفادة منه. مثلاً، لا يمكن للحيوانات وحيدة المعدة كالخنازير والدواجن أن تهضم حمض الفايتك (إينوسيتول هيكساكسفوسفات Inositol hexakisphosphate)، وهو المركب الرئيسي لتخزين الفوسفور عند

النباتات البقولية مثل فول الصويا. إن الحاق أنزيم الفايتاز phytase إلى العلف يؤمن فائدتين: الأولى، أن هذا الأنزيم بتحليله hydrolyses حمض الفايتك، فإنه ينزع العديد من مجموعات الفوسفات عن الحمض، وبذلك يجعل كمية إضافية من الفوسفات متاحة كمادة غذائية. والثانية، أن تحطيم حمض الفايتك يؤدي إلى التخفيف من التأثير الضار في البيئة الذي يسبّبه إطلاق الفوسفور العضوي في روث الحيوانات.

2.4.20 أنزيمات التنظيف Detergent enzymes

تتطلب العناية المنزلية الحديثة مستحضرات تنظيف لإزالة أصعب البقع مهما كانت درجة الحرارة المستخدمة في التنظيف. إن الاستعمال الأكثر انتشاراً على الإطلاق اليوم للأنزيمات هو في مجال التنظيف، حيث تستعمل في الغسيل والجلي المنزلي، كما في التنظيف في المؤسسات والشركات الصناعية. تشتمل الفوائد الأساسية لاستخدام الأنزيمات في مستحضرات التنظيف على:

- قدرة تنظيف أفضل.
- وقت تنظيف أقصر.
- استهلاك أقل للطاقة من خلال خفض درجات الحرارة المستخدمة في عملية التنظيف.
- استهلاك أقل للماء من خلال تحقيق فعالية تنظيف أكبر.
- تأثير أقل على البيئة لأن الأنزيمات المستخدمة قابلة للتفكك حيوياً.
- تأثير أقل على البئية من خلال تخفيض استخدام الكيماويات في التنظيف مثل الفوسفات.
- تجديد الأنسجة القطنية من خلال تأثير أنزيمات السيليولاز في الألياف، وأخيراً،
- إزالة البقع عن النسيج وجعله أكثر بياضاً.

إن أنزيمات التنظيف الأكثر استخداماً هي أنزيمات الهيدرولاز (Hydrolase)، التي تزيل بقع البروتينات، والليبيدات، وعديدات السكر. تاريخياً، كانت أنزيمات البروتياز الأنزيمات الأولى التي استخدمت بكثافة في غسيل الثياب. أما حالياً، فقد انضم إلى البروتياز أنزيمات اللايباز، والأميلاز، والسيليولاز من

أجل زيادة فعالية المنظفات، خاصة أثناء الغسيل المنزلي على درجات حرارة أقل. تؤمن، أنزيمات السيليولاز تنظيف الأنسجة بالإضافة إلى العناية بها من خلال تفاعلاتها الانتقائية التي تساهم في تجديد والحفاظ على مظهر الرداء المغسول. إن العديد من العلامات التجارية للمنظفات هي قائمة على أساس استخدام خليط من اثنين أو ثلاثة أو حتى أربعة أنزيمات مختلفة. ويكمن التحدي الأساسي الذي يواجه تطوير أنزيمات جديدة أو تعديل منتجات المنظفات الموجودة في جعل هذه الأنزيمات أكثر تحملاً لمكونات المنظفات مثل أساس المنظف، أو مخفضات التوتر السطحي، والكيماويات المبيضة. إن التوجه نحو استخدام درجات حرارة أقل أثناء غسيل الثياب، خاصة في أوروبا، زاد من الحاجة إلى إضافة أنزيمات التنظيف. فمن الأسهل إزالة بقع النشاء والدهون باستخدام ماء شديد السخونة، ولكن القوة التنظيفية الإضافية التي تؤمنها الأنزيمات ضرورية عند استخدام ماء أكثر برودة.

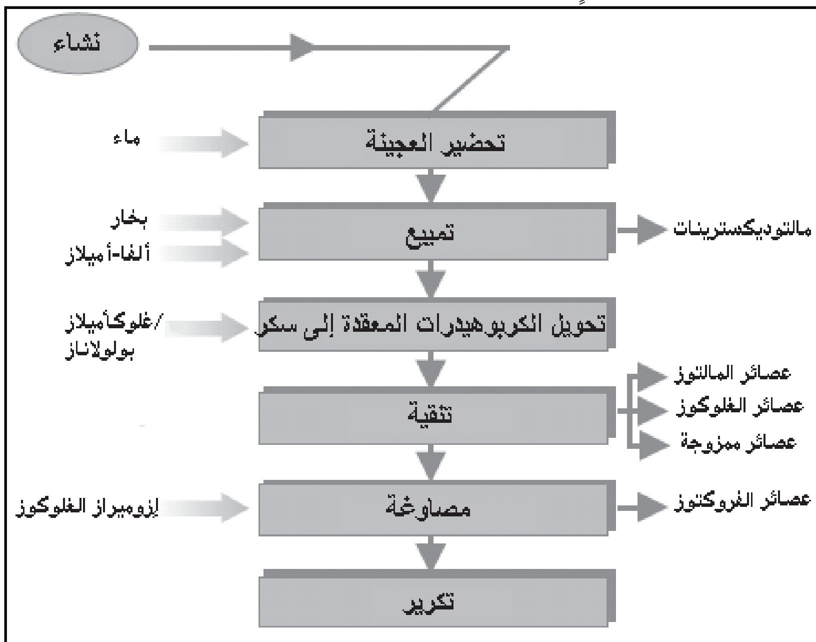
3.4.20 النشاء والوقود Starch and fuel

هناك العديد من المنتجات القيّمة التي يمكن اشتقاقها من النشاء. والذرة هي المادة الأولية الأكثر انتشاراً التي تُستخدم في صناعة النشاء، ثم يليها القمح، والتابيوكا tapioca، والبطاطا. إن فعاليتها في التفاعلات، وعملها النوعي ومقدرتها على العمل تحت ظروف معتدلة، صفات تجعل الأنزيمات حفازات مثالية في صناعة معالجة النشاء. إذ إن استخدامها في الصناعة يوفر خيارات إضافية لأمثلة الإنتاج، فالقيم المعتدلة لدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني pH المستخدمة في التفاعلات المحفزة أنزيمياً يعطي منتجات ثانوية، تؤثر في النكهة واللون، أقل من تلك التي تُعطيها طرق المعالجة القديمة التي يتخللها تحليل حمضي. إضافة إلى ذلك، تتميز التفاعلات الأنزيمية بإمكانية السيطرة عليها بسهولة إذ يمكن إيقافها لدى الوصول إلى الدرجة المرغوبة من تحويل النشاء. بناءً على هذا، بدأت صناعة النشاء باستخدام الأنزيمات الصناعية من أجل المعالجة على مستوى ضخم في الستينيات من القرن الماضي. وكانت أول المركبات التي أنتجت كلياً بواسطة عمليات أنزيمية هي أنواع خاصة من العصائر (Syrup) لم يكن إنتاجها ممكناً بواسطة الانحلال الكيميائية التقليدي. لقد شكل أول أنزيم أنتج (الغلوكوأميلاز) في أوائل الستينيات نقطة تحول رئيسية في

الصناعة الغذائية. فبعد ذلك بقليل تغير أسلوب إنتاج كل ما ينتج من الغلوكوز تقريباً من التحليل بالحمض إلى التحليل الأنزيمي، وذلك بسبب الفائدة الواضحة على المنتج المتمثلة بعطاء أكبر، ودرجة نقاوة أعلى، وتشكل بلورات أسهل.

إن أنزيمات ألفا–أميلاز المستقرة على درجات الحرارة العالية هي أنزيمات ملفتة تم اكتشافها في أوائل السبعينيات من القرن الماضي. يمكن لهذه الأنزيمات أن تبقى حية على درجات حرارة أعلى من درجة الغليان، وهي أنزيمات أحدثت ثورة في في عالم الاستخلاص الصناعي للسكر من النشاء وذلك لإمكانية استخدامها في الطباخات النفاثة (Jet cookers) التي تميع (تسيل) حبيبات النشاء الصلبة. والاختراق الهام الآخر الذي تحقق في العام 1973 هو تطوير أنزيم أيزوميراز

الغلوكوز المقيد الحركة من قِبل شركة نوفوزيمز (Novozymes). لقد جعل هذا الأنزيم الإنتاج الصناعي لشراب غني بسكر الفركتوز أمراً ممكناً. فهو إنجاز ضخم أدى إلى ولادة صناعة قيمتها بلايين عديدة من الدولارات في الولايات المتحدة الأمريكية تقوم على إنتاج عصائر ذات محتوى عالٍ من الفركتوز تستخدم كمحليات في أنواعٍ عديدة من المنتجات الغذائية.



الشكل 7.20: الخطوات الرئيسية في المعالجة الأنزيمية للنشاء والحصول على محليات متنوعة.

يظهر الشكل 7.20 لمحة عامة عن الخطوات الرئيسية المستخدمة في معالجة النشاء. نشاء الذرة هو المادة الأولية الأكثر استخداماً، ولكن بسبب طبيعته غير المنحلة والحبيبية، يجب أولاً جعله هلامياً ومائعاً وذلك ليصبح أكثر عرضةً للهجوم الأنزيمي. ويتم ذلك بتسخين النشاء بالبخار مع إضافة أنزيم ألفا–أميلاز الثابت حرارياً إلى مفاعلات ذات أحواض مزودة بخلاطات أو في طباخات نفاثة. عندها يقوم أنزيم ألفا–أميلاز بحل روابط ألفا–4,1–الغلايكوزيدية (α-1,4-glycosidic bonds) في النشاء الهلامي، مخفضاً بذلك لزوجته مما يؤدي إلى تحرير المالتوديكسترينات (Maltodextrins)، ويمكن أن تؤدي عمليات تحليل أخرى ناجمة عن إضافة أنزيمات الغلوكوز أميلاز، وألفا أميلاز فطري المنشأ، وأنزيم بولّولاناز (Pullulanase) إلى الحصول على عصائر متنوعة. فمن الممكن أن يتصاوغ (يتزامر) الغلوكوز إلى فركتوز باستخدام أنزيم الغلوكوز أيزوميراز المقيّد الحركة. مع مرور الوقت، يفقد الأنزيم المقيد فعاليته فيتم استبداله، وذلك عادةً عندما تنخفض فعاليته إلى 10–15% من الفعالية الابتدائية.

تستخدم الأنزيمات أيضاً في إنتاج الإيثانول من النشاء لاستعماله كوقود، وهو منتج يمثل أحد أكثر مصادر الطاقة المتجددة الواعدة. في هذه العملية، يجري تحليل النشاء إلى غلوكوز، والذي يُحوَّل بعد ذلك إلى إيثانول عن طريق تخميره بالخميرة. يمكن إنتاج الإيثانول المخصص للوقود من ركائز نشوية تتوافر في مواد أولية متجددة كالذرة، والقمح، والأرز. وإيثانول الوقود لا يشكل مصدراً متجدداً للطاقة فحسب، بل إن احتراقه أنظف من احتراق البنزين (الغازولين) حيث إن الانبعاثات المؤذية الناتجة من احتراقه هي أقل، فهو يقدم بديلاً قابلاً للتفكك حيوياً عن المادة المضافة المزودة بالأوكسيجين من الغازولين، ميثيل ثلاثي البوتيل الإيثيري Methyl tertiary butyl (MTBE) وهي مادة ملوثة اكتشف وجودها في ماء الشرب في أجزاء عديدة من العالم.

إن الطلب على إيثانول الوقود هو أعلى من أي وقت مضى. ففي السنوات القليلة الأخيرة، تعاونت شركات الأنزيمات مع وزارة الطاقة الأمريكية من أجل

تطوير تقنيات أنزيمية جديدة (قائمة على أنزيمات السيليولاز والهيميسيليولاز) تمكِّن من إنتاج إيثانول الوقود من مخلَّفات سيليولوزية مثل قش الأرز، ونشارة الخشب، وقوالح الذرة. وفي حين أن النشاء هو المادة الأولية المفضلة اليوم، إلا أن التركيز في المستقبل سيكون على السيليولوز– وهو البوليمر العضوي الأكثر توفراً على سطح الارض. ينظر إلى الغلوكوز المشتق من النشاء وكذلك السيليولوز على أنه المادة الأولية التي ستستبدل الكربون البترولي من أجل تصنيع الجزيئات العضوية وبوليميرات المستقبل. لقد أطلق على المنشآت المستقبلية التي تجمع بين تقنيات تحويل النشاء والسيليولوز لإنتاج الوقود، والطاقة والكيماويات من مواد قابلة للتجدد في *مصافٍ حيوية biorefineries*. إن مفهوم المصفاة الحيوية (معمل تكرير حيوي) مشابه لمفهوم مصافي البترول المعروفة حالياً، التي تنتج أنواعاً متعددة من الوقود والمنتجات من البترول.

4.4.20 النبيذ والمشروبات Wine and beverages

يمتلك العنب أنزيمات تضم بشكلٍ أساسي أستراز البكتين pectinesarase والبولي غالاكتيوروناز polygalacturnase ، وهي غالباً ما تكون غير كافية لتحليل مواد البكتين، كما أن تأثيرها ضعيف جداً في عديدات السكريات المعقدة الموجودة في الجدار الخلوي. لذلك ومنذ إدخال أنزيمات البكتيناز إلى صناعة النبيذ في سبعينيات القرن الماضي، فإن تطوير أنزيمات نوعية لتحطيم الجدار الخلوي يمنح صانعي النبيذ الفرصة لتحسين نوعية النبيذ وزيادة مرونة العملية الإنتاجية. تُستخدَم مستحضرات الأنزيمات أثناء عملية النقع (معالجة الهريس) من أجل تحلل كلٍّ من اللون، ومركبات النكهة والعصير؛ وفي مرحلة التصفية (معالجة العفن) من أجل تسريع عملية الترسُّب والإيناع (النضوج) مما يساعد على إطلاق نكهة النبيذ، وتوازن قوامه وترشيحه:

- تعرف أنزيمات الغلايكوزيداز بتاثيرها في المركبات السالفة للنكهة. يمكن لهذه الأنزيمات أن تعزز من نكهة العنب المسكي Muscat أو أي أنواع عنب مشابهة تحتوي على تربينات terpenes مرتبطة.

- تم تطوير خلطات من أنزيمات البكتيناز وبيتا–غلوكاناز من أجل تحليل المواد الغروانية التي تتشكل في النبيذ من خلال التفاعل المتبادل بين غلوكانات الخميرة وبكتينات العنب خلال عملية التخمر، مما ينتج منه تحسن في تصفية النبيذ، وترشيحه وتوازن قوامه بعد التخمير. كما يسرع هذا الخليط الأنزيمي عملية تعتيق النبيذ، وبذلك يقلّل زمن التلاقي بين الغلوكان والبكتين، ويجعل عملية التصفية أسرع.
- تستخدم مستحضرات من البيتا–غلوكاناز لمعالجة النبيذ المنتج من العنب المصاب بفطر عفن البوترايتس *Botrytis cinerea*. يطلق على هذا الفطر اسم "العفن النبيل" الذي يصيب آخر محصول العنب المستخدم في إنتاج الخمور. يمكن إضافة أنزيم بيتا–غلوكاناز مع اقتراب نهاية عملية التخمر الكحولي أو قبل تخمر المالولاكتيك (Malolactic)، وذلك بحسب ما هو مفضل.

جرت ممارسة عملية إنتاج المشروبات الكحولية المخمرة من مواد أولية أساسها النشاء (مثلاً، فاكهة، نبيذ، قصب سكر، بطاطا، والحبوب) منذ قرون. في أغلب الأحيان يتم تقطير الكحول للحصول على شراب كحولي (Liquor) ذي محتوى عالٍ من الكحول. ما قبل الستينيات من القرن الماضي كان تحليل النشاء ينجز بإضافة المالت malt أو الكوجي koji (وهو أرز مخمر)، الذي كان مصدر الأنزيمات التي تحول النشاء إلى سكريات قابلة للتخمر. أما اليوم، وفي معظم الدول، استبدلت إضافة المالت كلياً بإضافة أنزيمات تجارية منتقاة بشكلٍ مباشر. يمكن استخدام بضعة ليترات من مستحضر الأنزيم لاستبدال 100 كيلوغرام من المالت. وبهذه العملية يمكن توقع توفير في كلفة المواد الأولية بنسبة 20–30% عند التحول إلى استخدام الأنزيمات التجارية. علاوة على ذلك، تكون مستحضرات الأنزيمات ذات فعالية متجانسة ومعايَرة، بحيث يصبح ممكناً أكثر التنبؤ بمسار عملية تحليل النشاء، ما يقود إلى تحسين في انسجام عملية التخمير. وأخيراً، إن أداء الأنزيمات الصناعية أفضل من تلك التي توجد في المالت. إذ تمتلك أنزيمات الأميلاز الميكروبية (المستخلصة من الجراثيم) فعالية أفضل عند رقم هيدروجيني

منخفض من تلك الموجودة في هريس المالت. كما تمتاز أنزيمات أميلاز بثباتية حراري عالية إلى درجة إمكانيتها تمييع النشاء عند درجة حرارة 100 م°، في حين تكون أنزيمات المالت عند درجة حرارة أقل من ذلك بكثير قد تعطلت.

5.4.20 صناعة البيرة (الجعة) وصناعة الخبز Brewing and baking

تنتج البيرة تقليدياً عن طريق مزج شعير مُنبّت مجروش مع الماء الساخن في أوعية دائرية ضخمة تدعى مرجل الهريس (العصيدة). بالإضافة إلى الشعير المنقوع، يمكن إضافة الحبوب كالذرة، والذرة البيضاء (السورغم Sorghum)، والأرز أو حتى نشاء خالص إلى الهريس كمواد مساعدة. يجري بعد ذلك ترشيح الهريس للحصول على سائل يعرف بالنقيع الحلو. يغلى النقيع مع حشيشة الدينار لتعزيز النكهة، ثم يبرد، وينقل إلى أحواض تخمير حيث يمزج مع الخميرة. بعد التخمير تترك البيرة لتنضج قبل أن يجري ترشيحها وتعبئتها. تستخدم الأنزيمات في العديد من مصانع البيرة لزيادة فعالية عملية التخمير ولتعزيز السيطرة على هذه العملية، وبذلك إنتاج بيرة ذات نوعية عالية على الدوام. وغالباً ما تستخدم أنزيمات مساعدة من أجل أمثلة عملية تمييع المواد المساعدة، وإنتاج بيرة قليلة الكربوهيدرات ("بيرة خفيفة")، وتسريع النضوج وإنتاج بيرة من مالت وحبوب مدعَّمة.

لقد حققت الأنزيمات نجاحاً عظيماً في مجال صناعة الخبز، حيث استخدمت الأنزيمات الفطرية، ألفا–أميلاز لعقود من أجل تفكيك النشاء إلى مالتوديكسترينات حتى تتمكن الخميرة من العمل عليها. يمكن استخدام نوع جديد من أنزيم الأميلاز من أجل تعديل جزء محدد من النشاء، ومنع تغير طعم الخبز مع الوقت مما يطيل مدة صلاحية الخبز. لقد حصل عدد من التطورات الجديدة والمثيرة في استعمال الأنزيمات في مجال صناعة الخبز. مثلاً، يمكن استخدام الأنزيمات المؤكسدة كبديل عن برومات البوتاسيوم، وهي مادة كيميائية مضافة تم منع استخدامها في عدة دول. والغلوتين في الطحين هو مجموعة من البروتينات التي تشكل شبكة متداخلة كبيرة أثناء تشكل العجين. تحجز شبكة الغلوتين غاز ثاني أكسيد الكربون المنطلق خلال عملية اختمار العجين وخلال عملية الخبز، وقوة هذه الشبكة مهمة جداً من أجل نوعية الخبز المختمر. يمكن لأنزيمات مثل الزايليناز (الهيميسيليولاز)، واللايباز والأوكسيداز أن تزيد من قوة الغلوتين، وبذلك فهي تحسن من نوعية الخبز الناتج.

6.4.20 الفواكه والخضار Fruits and vegetables

لعبت الأنزيمات خلال العقود القليلة الماضية دوراً أساسياً في تطوير تقنيات جديدة لمعالجة الفواكه. الآن، تشكل الأنزيمات وسائل لا يمكن الاستغناء عنها بالنسبة إلى منتجي عصير الفاكهة فهي تمتلك منفعة اقتصادية مهمة من خلال زيادة ناتج العصير. إن الأنزيمات الخاصة المحلِّلة للبكتين هي أنزيمات مهمة في تعزيز ناتج العصير وطاقة عملية المعالجة وذلك من خلال تحطيمها الانتقائي للبكتين. والبكتين هو من عديدات السكر النباتي الطبيعي، يتواجد في جميع الفواكه ويتألف بشكل أساسي من حمض الغالاكتورونيك. يمكن لهذه المجموعات الحمضية أن تتواجد بشكل حر، أو مرتبطة على شكل أستر الميثيل، أو كأملاح الصوديوم، أو البوتاسيوم، أو الكالسيوم، أو الأمونيوم. يعمل البكتين كصمغ خلوي يعطي ثمرة الفاكهة بنيتها. وفي هريس الفاكهة، يرتبط البكتين بالماء، مما يؤدي إلى زيادة اللزوجة، ويجعل من الصعب إطلاق العصير من الثمرة المهروسة. وخلال مراحل الإنتاج المتأخرة، يجب تحليل البكتين لتمكين عملية تصفية وترشيح منتج العصير النهائي. غالباً ما ترشح معالجات عصير الفواكه العصير بواسطة تجهيزات خاصة ذات قدرة فائقة على الفلترة؛ ولكن عملية فلترة العصير ستكون شديدة البطء ومرتفعة الكلفة إذا ما تمّت بدون استخدام الأنزيمات التي تحطم البكتين.

ومن الاستعمالات الخاصة لأنزيم أستراز البكتين، استخدامه في الحفاظ على قطع الفاكهة سليمة في المستحضرات التي تحوي قطع من الفاكهة. هذه المعالجة مرغوبة في الفواكه المعلبة والمجمدة وذلك لمنع قطع الفاكهة من أن تصبح طرية جداً. كذلك يستخدم أنزيم أستراز البكتين من أجل الحفاظ على تماسك قطع الخضار المحضرة.

7.4.20 منتجات الغابات Forest products

تقدم الأنزيمات فوائد هامة للصناعة القائمة على استخدام الأحراج، وأكثرها أهمية هي تلك المتعلقة بحماية البيئة. في تسعينيات القرن الماضي تم إدخال أنزيمات زيلاناز (Xylanases) النوعية من أجل تخفيض كمية الكيماويات، مثل الكلور وثاني أوكسيد الكلور، المستخدمين في إزالة لون لباب الخشب (Wood

(pulp. إذ تعطي أنزيمات الزايليناز، كبديل للكيماويات المبيضة الجالفة، تخفيضاً مماثلاً في كمية المركبات العضوية المكلورة المؤذية التي تطلق في البيئة. كما أن هناك توجهاً عاماً في مختلف أنحاء العالم نحو الحدّ من كمية الكلور المستخدمة في تبييض لباب الورق، فالتشريعات البيئية تصبح أكثر تشدداً، ويترافق هذا مع طلب متزايد لإنتاج ورق خالٍ تماماً من الكلور .

هناك توجه آخر آخذ في النمو وهو إعادة تدوير الورق المستخدم. وعلى سبيل المثال، يعاد تدوير حوالى 30% من الورق المستخدم في الولايات المتحدة الأمريكية. وفي هذا المجال، جرى تطوير عمليات لإزالة الحبر من ورق نفايات المكاتب، وذلك باستخدام خلطة من أنزيمات سيليولاز مميزة تخفض بشكل ملحوظ استخدام الكيماويات المؤذية للبيئة. كما أن هذه الأنزيمات تساعد آلات إنتاج الورق للحفاظ على سرعة عالية من العمل بشكل سلس، وذلك عن طريق إزالة القار أو المواد الملوِّثة. والقار هو مادة راتنجية، في حين أن المواد الملوِّثة هو مصطلح عام يطلق على الترسبات الميكروبية (الجرثومية). يمكن إزالة هاتين المادتين غير المرغوبتين أنزيمياً من آلات صناعة الورق، بدلاً من استخدام الصودا الكاوية والمؤذية، إضافة إلى تخفض الزمن اللازم لتنظيف الآلة.

8.4.20 منتجات الألبان Dairy

يعود استعمال الأنزيمات في معالجة منتجات الحليب إلى بدايات التاريخ المسجل. ومنذ غابر العصور، استخدمت مستخلصات معدة العجول، المحتوية على أنزيم التجبين الكيموزين (Chymosin)، لتخثير الحليب وإنتاج الجبن. وفي أيامنا الحاضرة، يتم انتاج أنزيم الكيموسين البقري داخل كائنات مجهرية مأشوبة، إضافةً إلى وجود العديد من أنزيمات البروتياز الجرثومية التي تباع كبدائل عن الكيموزين. تتكون مخثرات الجبن الطازج من بروتين الحليب (الكاسين Casein)، والدهون، الكربوهيدرات والأملاح. تمتلك هذه المركبات طعماً خفيفاً، ولكن النكهات المميزة للجبن الناضج (المعتق) تتطور كنتيجة للتحليلات الأنزيمية المتواصلة للبروتينات والدهون. يتطلب إنضاج الجبن بالطريقة التقليدية تخزيناً طويل الأمد، ومساحات رحبة ودرجات حرارة ورطوبة مضبوطتين. وبذلك فهي

عملية مكلفة جداً. يمكن عن طريق إضافة أنزيمات نوعية، القيام بتسريع عملية إنضاج الجبن وبأقل كلفة، خاصة في حالة تصنيع أنواع الأجبان الجافة نسبياً والبطيئة النضج. لقد ركزت معظم الأبحاث حول إنضاج الجبن على إحداث تحللٍ طفيف للبروتينات كما في جبنة الشيدار. تشتمل هذه العملية على تشكل أحماض أمينية وببتيدات قصيرة بواسطة أنزيمات ببتيداز داخلية وخارجية بغية تسريع تطور مواصفات نكهة الشيدار وطعمها. لقد جرى اعتماد أنزيمات اللاليباز كبديل لعجينة المنفحة (Rennet)، وهي عبارة عن مستخلص معدة العجول أو الخرفان الرضيعة. وتستخدم المنفحة كمصدر لأنزيمات اللاليباز من أجل تعزيز حدة طعم الأجبان الإيطالية ولأجبان الزرقاء. يمكن لعددٍ من أنزيمات اللاليباز الجرثومية (من أصل ميكروبي) أن تنتج أشكالاً من أحماض دهنية ذات سلاسل قصيرة مشابهة لتلك التي تتواجد في عجينة المنفحة. فهذه العجينة هي ممنوعة في بعض الدول بسبب احتمال وجود مخاطر صحية مرتبطة باستخدامها.

5.20 المظاهر الرقابية والأمانية

Regulatory and safety aspects

إن الأمان والجودة هما موضوعان على غاية من الأهمية في جميع عمليات الإنتاج. وينطبق هذا أيضاً عندما تستخدم تقنيات الطبيعة ذاتها- الأنزيمات- في العمليات التصنيعية. بالرغم من أن الأنزيمات هي منتجات طبيعية، وأن استخدامها في السابق في معالجة الغذاء يبيّن أمانها، إلا أن الشركات المسؤولة تسعى إلى التأكد من أن منتجاتها لا تشكل أي خطر على الزبائن والمستهلكين. إن الوضع الرقابي للأنزيمات التقنية، وتصنيفها، وتسميتها محكوم في معظم الدول بالقوانين الوضعية المتعلقة بالمواد الكيميائية. ومعظم هذه الأنزيمات مدرجة في قوائم جرد الكيماويات المعروفة، مثل قائمة جرد المواد التجارية المتوافرة الأوروبية (European Inventory of Existing Commercial Substance (EINECS)) في دول الإتحاد الأوروبي، وقانون التحكم بالمواد السامة Toxic Substances Control Act (TSCA) في الولايات المتحدة الأمريكية. وبسبب كونها منتجات طبيعية، فإن بعض الأنزيمات مستثناة من إدراجها في القائمة. ولكن في حالات أخرى تدرج بعض الأنزيمات ضمن تشريعات محددة تغطي منتجات التقانة الحيوية.

يُنظم استعمال الأنزيمات في معالجة الأغذية من قبل وكالات حكومية تشرف على نقاوة الغذاء وتشريعات الأمان. داخل الاتحاد الأوروبي، قامت الدول الأعضاء بتوفيق التشريعات والتوجيهات المتعلقة بالكيماويات فيما بينها. وأنشأ اتحاد خبراء لجان –منظمة الزراعة والأغذية الدولية /منظمة الصحة العالمية FAO/WHO– للإضافات الغذائية Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) ولجنة مخطوطات الكيماويات الغذائية Food Chemicals Codex (FCC) القواعد التوجيهية التي تنظم استخدام الأنزيمات كمضافات غذائية. كما تقوم وكالات دولية مثل وكالة AMFEP (أوروبا) ومجموعة الأنزيمات التقنية (في الولايات المتحدة الأمريكية) بوضع مقاييس للتشريعات الدولية. فقد وضعت هذه الوكالة الأوروبية المذكورة (AMFEP) المعايير القياسية *للمارسة التصنيعية الجيدة* Good Manufacturing Practice (GMP) المتعلقة بأنزيمات الغذاء المأخوذة من الجراثيم، إذ يحرص أعضاؤها على ضمان أن الأنزيمات المستخدمة في معالجة الأغذية تؤخذ من كائنات مجهرية غير ممرضة وغير سامة. وفيما يتعلق بسلالات الكائنات المجهرية التي تحتوي على DNA مأشوب والمستخدمة في العملية الإنتاجية وهي ما يدعى بالكائنات المعدلة وراثياً Genetically Modified Organisms (GMOs)، يجري تقويم مواصفات كافة الكائنات المانحة التي تعطي مادة وراثية للسلالة التي تدخل في العملية الإنتاجية، كما يجري تقويم سجل أمانها الحيوي أيضاً.

وبناءً على معايير الحكومات القياسية في جميع أرجاء العالم، يتوجب على شركات الأنزيمات ضمان أن منتجاتها لا يمكن أن تؤذي الناس أو البيئة، كأن تؤدي، مثلاً، إلى حدوث حساسية. إن أحد الأجزاء الهامة في هذه العملية هو جمع البيانات عن سميّة البروتين، والتأكد من تحقيقها متطلبات الوكالات التشريعية أمثال إدارة الغذاء والدواء الأمريكية US Food and Drug Administration (FDA) أو وكالة حماية البيئة Environmental Protection Agency (EPA). يجري حث مصنعي الأنزيمات، أينما كان ذلك ممكناً، على استخدام اختبارات في الزجاج أو أي اختبارات بديلة عن استخدام الحيوانات الحية، مثل

مزارع الخلايا، أو البكتيريا، أو أعضاء مأخوذة من مسالخ الحيوانات. لقد كان معروفاً منذ أواخر الستينيات من القرن الماضي أن الأنزيمات قد تحدث تفاعلات حساسية لدى بعض الأشخاص إذا ما استُنشقت كغبار أو رذاذ. وهو تأثير شبيه بالحساسية الناجمة عن استنشاق حبوب الطلع، وبقايا حيوانية، وغبار العث. إن الحساسية للأنزيمات هي حصراً أخطر تأثير صحي متعلق بمكان العمل، ولم تسجل أية حالات تأثيرات صحية للأنزيمات بين المستهلكين لحوالى 30 عاماً تقريباً. يمكن منع الحساسية المرتبطة بمكان العمل ببساطة عن طريق إزالة الغبار المنتشر في الهواء أو الرذاذ، وذلك باستخدام مستحضرات سائلة أو حبيبية.

6.20 قراءات إضافية Further reading

Alberghina, L. (ed.). *Protein Engineering in Industrial Biotechnology*. Amsterdam: Hardwood Academic, 2000.

Flickinger, M. C. and S. W. Drew (eds.). *The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. New York: John Wiley Sons, 1999.

Godfrey, T. and S. West (eds.). *Industrial Enzymology*. 2nd ed. New York: Stockton Press; London: Macmillan, 1996.

Kearlsley, M. W. and S. Z. Dziedzic (eds.). *Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivatives*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995.

Kirk, O., T. V. Borchert, and C. C. Fuglsang, "Industrial Enzyme Applications," *Current Opinions in Biotechnology*, vol. (2002), pp. 345-351.

Panke, S. and M. G. Wubbolts, "Enzyme Technology and Bioprocess Engineering," *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 13 (2002), pp. 111-116.

Uhlig, H. (ed.). *Industrial Enzymes and Their Applications*. New York: John Wiley Sons, 1998.

Van Beilen, J. B. and Z. Li, "Enzyme Technology: An Overview," *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 13 (2002), pp. 338-344.

الفصل الواحد والعشرون

البروتينات المأشوبة عالية القيمة

Recombinant Proteins of High Value

Georg-B. Kresse **جورج ب. كريسي**

Roche Diagnostics GmbH, Germany **روش للتشخيصات GmbH، ألمانيا**

1.21 استعمالات البروتينات عالية القيمة

Application of high-value protein

إن البروتينات المستخدمة في تقانة الأنزيمات الصناعية، مثلاً أنزيمات بروتيناز[1] في المنظفات أو الأنزيمات المستعملة في الصناعات الغذائية، هي في معظم الحالات مستحضرات غير متقنة الصنع، وعادةً ما تكون في خلائط مع أنزيمات مختلفة. بالمقابل، هناك عدد من الاستعمالات التجارية التي تحتاج إلى بروتينات عالية النقاوة (ولذلك هي عالية القيمة). والأمثلة هي:

- *الأنزيمات التحليلية ومضادات الحيوية*: المستخدمة في وسائل التشخيص الطبية، وتحليل الطعام، بالإضافة إلى التحليل الكيميائي الحيوي والبيولوجي الجزيئي (انظر الفقرة 2.21).
- *الأنزيمات المستخدمة كأدوات في تقانة الهندسة الوراثية*: لقد باتت تقانة الجينات ممكنة من خلال توفر أنزيمات عالية النقاوة تضم أنزيمات الاقتطاع

[1] بروتياز أو بروتيناز proteinase أو protease: هو أنزيم تحليل البروتين.

النيوكليوتيدي الداخلية[2]، وأنزيمات بوليميراز[3] الــ DNA والــ RNA، وأنزيمات النيوكلياز[4] والأنزيمات المعدِّلة (انظر الفصلين الرابع والخامس). كذلك، تستخدم أنزيمات الغلايكوهيدرولاز[5] وترانسفراز الغلايكوزيل[6] بشكل متزايد في التقانة الحيوية الغليكوجية[7] وذلك بغرض إجراء تعديلات على الأجزاء السكرية من البروتينات السكرية Glycoproteins.

- *البروتينات العلاجية*: تُستخدم عوامل النمو، ومضادات الحيوية والأنزيمات بوصفها مكونات الدواء الفعالة لعلاج الأمراض (انظر الفقرة 3.21).

إضافةً إلى ذلك، هناك حاجة إلى البروتينات المرتبطة بيولوجياً، سواءٌ كان بشكلٍ مُثبَت أو مفترض، بآليات تطور الأمراض من أجل استخدامها كأهداف للبحث عن روابط Ligands (روابط تشاركية Agonists أو تضادية Antagonists) أو مثبطات، وأيضاً من أجل تحليل بنيتها بواسطة الأشعة السينية أو الرنين المغناطيسي النووي NMR[8] الذي يقدم نماذج جزيئية مبنية على أساس بنية المركب تساعد في تصميم مركبات بروتينية متفاعلة. ويتطلب هذا إنتاج البروتينات على نطاق صغير نسبياً (10–100 ميللغرام)، ولكن في أغلب الأحيان بنقاوة عالية اعتماداً على استخدامها المرغوب.

---

[2] أنزيمات اقتطاع نيوكليوتيدي داخلية endonucleases: أنزيمات تقطع سلسلة نيوكليوتيدات محددة داخل سلسلة الحمض النووي (DNA).

[3] البوليميراز polymerase: هي أنزيمات تقوم بإنشاء سلاسل الــ DNA و الــ RNA.

[4] النويكلياز nuclease: هو أنزيم تحليل (اقتطاع) الــ DNA، وهو نوعان؛ أنزيم اقتطاع داخلي endonuclease وأنزيم اقتطاع. خارجي exonuclease (يقوم بتقطيع نيوكليتيدات سلسلة الــ DNA ابتداءاً من النهاية 3′).

[5] الغلايكوهيدرولاز glycohydrolase: هو أنزيم تحليل السكر.

[6] ترانسفيراز الغلايكوزيل glycosyl transferase: ناقل الغلايكوزيل.

[7] التقانة الحيوية الغلايكوبيوجية: glycobiotechnology.

[8] NMR: Nuclear Magnetic Resonance.

2.21 الأنزيمات التحليلية Analytical enzymes

الأنزيمات هي جزيئات عالية النوعية سواء في نوع التفاعل الذي تتولى تحفيزه أو في اختيار المادة الأولية. فعلياً، إن الأنزيمات، إلى جانب الأجسام المضادة، هي أكثر مواد التفاعل (الكواشف) المعروفة نوعيةً. لذلك، يقدم استخدامها في التحليل، خاصة في مجال التشخيص الطبي والتحليل الغذائي، عدداً من الفوائد مقارنة بالكواشف الكيميائية. يمكن للمتفاعلات (Reactants) (إذا كانت مواد أولية) أن تتحول كيميائياً في وجود الأنزيمات، أو أن تعدّل الفعالية الأنزيمية بطريقة ترتبط بتركيزها (إذا كانت تعمل كمفعّلات أو مثبطات). وتقوم الأنزيمات أيضاً بدور واسمات في تقنيات المعايرات القائمة على تفاعلات غير أنزيمية، مثل تفاعل الارتباط بين الجسم المضاد والمستضد (انظر الفصل الخامس والعشرين) أو التهجين بين DNA وقليلات النيوكليوتيد (Oligonucleotide).

لقد أصبح ممكناً من خلال تقانة الــ DNA المأشوب (Recombinant) كَلْوَنَة أي جين ذي أهمية، بالإضافة إلى التلاعب بخلايا البكتيريا، أو الفطريات، أو الحشرات، أو الثدييات بغية الإفراط في إنتاج البروتين المرغوب. وقد جرى التعبير عن العديد من الأنزيمات داخل كائنات مجهرية مأشوبة بمستويات أعلى بــ 10 إلى 100 مرة من مستوى تعبيرها في خلايا العائل الطبيعي. مما أفسح المجال في تحقيق اقتصاديات أفضل لإنتاج الأنزيمات، بالإضافة إلى تخفيضات هامة في الأعباء البيئية العائدة إلى تضاؤل الأحجام المستخدمة في عمليات التخمير (وبالتالي الفضلات الناتجة). زد على ذلك، لقد أتاحت تقانة التطفير الموجه في الموقع (In site-direct mutagenesis) السبيل إلى تحسين خصائص الأنزيمات المرتبطة بالاستعمالات (التطبيقات) التحليلية، مثل، ثباتيتها تحت شروط المعايرة المستخدمة، أوالرقم الهيدروجيني الأمثل لنشاطها أو درجة انحلاليتها.

الجدول 1.21: أمثلة عن الأنزيمات الهامة في الكواشف التشخيصية		
الأنزيم	**المصدر (الأصل)**	**يستخدم لمعايرة**
أوكسيداز الكوليستيرول Cholesterol oxidase	*Nocardia erythropolis or Brevibacterium sp.*	الكوليستيرول
الكرياتيناز Creatinase	*Pseudomonas sp.*	الكرياتين، الكرياتينين
الكرياتينيناز Creatininase	*Pseudomonas sp.*	الكرياتينين
بيتا- غلاكتوزيداز β- glactosidase	بكتيريا الإشريكية القولونية *Escherichia coli*	أيونات الصوديوم، أنزيمات واسمة للمعايرات المناعية
أوكسيداز الغلوكوز Glucose oxidase	فطر العفن الأسود *Aspergillus niger*	الغلوكوز
ديهايدروجيناز الغلوكوز 6- فوسفات Glucose 6- phosphate dehydroginase	*Leuconostoc mesenteroides*	الغلوكوز (أنزيم مؤشر)
ألفا-غلوكوزيداز α-glucosidase	الخميرة أو أنواع بكتيريا *Bacillus*	فعالية أنزيم ألفا-أميلاز
أوكسيداز الغليسيرول فوسفات-3 Glycerol-3-phosphate oxidase	*Aerococcus, viridans.*	الغليسيريدات الثلاثية
الهيكزوكايناز Hexokinase	الخميرة *yeast*	الغلوكوز والسكريات السداسية الأخرى
البيروكسيداز (Peroxidase)	الجرجار[9] *horseradish*	أنزيم مؤشر وأنزيم واسم يستخدم في المعايرات المناعية

[9] الجرجار: Horseradish، فجل حار.

أوكسيداز البيروفات Pyruvate oxidase	*Pedicoccu sp.*	البيروفات؛ فعالية أنزيم الترانس أميناز
أوكسيداز الساركوسين	*Pseudomonas sp., Bacillus sp*	الكرياتينين
أوكسيداز اليورات (Uricase)	*Arthrobacter protophormea*	حمض اليوريك
اليورياز (Urease)	*Klebsiella aerogenes*	اليوريا

1.2.21 الأنزيمات في المعايرات التشخيصية
Enzymes in diagnostic assays

في *المعايرات ذات نقطة نهاية (End-point assays)* يلعب المركب الذي يتوجب تحديد تركيزه (المركب المحلَّل *Analyte*) دور المادة الأولية في تفاعل يحفزه الأنزيم الذي يتم تحويله مع الإنتاج المتزامن والمتكافئ للإشارة التي يمكن أن تُلتَقط (مثلاً تغير إيجابي أو سلبي في الامتصاص الضوئي)، التي قد تنشأ إما من تحويل المركب المحلَّل نفسه أو من تحويل متصل مكافئ لمادة أولية مساعدة أو لعامل مساعد (مثل تشكل مساعد الأنزيم النيكوتين الأميدي الأدينيني الثنائي النيوكليوتايد الحامل للهيدروجين NADPH[10] في تفاعلات يحفزها أنزيم الديهيدروجيناز)[11]. يُسمح للتفاعل أن يستمر حتى الانتهاء، ويمكن بسهولة حسابة النتيجة من خلال الثوابت الفيزيائية المعروفة؛ مثل معامل الامتصاص المُولي (Absorption molar coefficient) في حالة المواد التي تمتص الضوء. يعتمد تخصص نظام المعايرة على تخصص (النوعية) الأنزيم المستخدم تجاه المادة الأولية. يعطي الجدول 1.21 لمحة عامة عن الأنزيمات الهامة المستخدمة في المعايرات التشخيصية. إن معظم الأنزيمات المستخدمة في التحليل الأنزيمي تؤخذ من البكتيريا والخميرة، وهي تنتج باستخدام أنظمة تعبير جرثومية (في الغالب بكتيريا القولونية الإشريكية *E. coli* أو الخميرة) لانخفاض كلفة الإنتاج.

---

[10] NADPH: nicotine amide adenine dinucleotide phosphate .

[11] الديهادروجيناز dehydrogenase: الأنزيم المزيل للهيدروجين.

إذا لم تُنتِج أي من المتفاعلات أو أي من نواتج التفاعل (المنتجات) إشارة يمكن تتبعها بمجرد حدوث التحول الكيميائي، فإنه يمكن قرن التفاعل الأوّلي (ويدعى "التفاعل المساعد") بتفاعل مرتبط به تكافؤياً "مؤشر" (وعادة ما يكون تفاعل محفز بأنزيم)، مع توفر إمكانية الكشف عن أحد نواتج هذا التفاعل الثاني بسهولة. عملياً، وفي غالب الأحيان، يمكن تحقيق اقتران تفاعلات مؤشرة عامة (غير متخصصة) بدون الحاجة إلى أمثلة فردية لأشكال التفاعلات المساعدة النوعية. ومن الأمثلة المعروفة عن الأنزيمات المؤشرة هو أنزيم بيروكسيداز فجل الجرجار horseradish peroxidase المستخدم في عدد كبير من المعايرات التجارية *المقترنة* بأنزيم الأوكسيداز[12] . يُظهر الشكل 1.21 مثالاً على معايرة غلوكوز مقترنة، تستخدم الأنزيمات المأشوبة كأنزيم مؤشر. وعلى نحو مماثل تستخدم أنزيمات (مثلاً، البيروكسداز، والفوسفتاز[13] القلوية) من أجل توليد الإشارة (كمؤشرات) في معايرات مناعية متصلة بالأنزيم تعرف باسم المعايرات المناعية الممتزة المتصلة بالأنزيم Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISAs) (انظر الفصل الخامس والعشرين).

في الظروف التي يكون فيها تركيز المادة الأولية الأنزيمية أقل من قيمة ثابت ميكايلس – مينتن[14] للأنزيم، وهو ما يدعى بـــ K_m، فإنه يمكن اشتقاق تراكيز المادة الأولية من خلال قياس حركية التفاعل (*معايرة حركية*)، لأن معدل التفاعل الملاحظ في هذه الحالة يصبح متناسباً خطياً مع تركيز المادة الأولية. تُقلل المعايرات الحركية زمن التحليل إلى حدٍّ كبير، وعلى العكس من المعايرات ذات نقطة نهاية فهي أقل حساسية للتداخلات (للتشويش)، كما تستخدم أنزيمات تمتلك قيمة K_m عالية (أي أن ألفتها للمادة الأولية المستخدمة منخفضة) وذلك من أجل زيادة نطاق التركيز الديناميكي للمعايرة. ومن أجل تسهيل التعامل مع مواد التفاعل (الكواشف)، غالباً ما

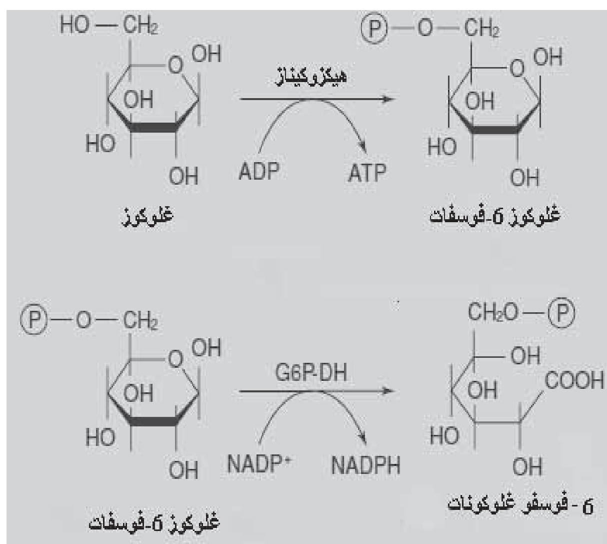
---

[12] الأوكسيداز oxidase: الأنزيم المؤكسِد.

[13] الفوسفتاز phosphatase: الأنزيم المزيل للفوسفات.

[14] ثابت ميكايلس–منتن k_m : وهو تركيز المادة الأولية للأنزيم النوعية التي يبدي الأنزيم عندها نصف سرعته القصوى في تحفيز التفاعل.

تستخدم أنزيمات مقيدة الحركة (Immobilised) للأهداف تحليلية. ومن المقاربات القديمة التي ما زالت مفيدة حتى الآن هي ربط الأنزيم برابط غير تشاركي[15] إلى الورق، وهو ما يستخدم بشكل واسع في *القصاصات الاختبارية (Test strips)* المستخدمة في معايرات العينات البيولوجية كالبول والدم. أما في حالة *المستشعرات الحيوية (Biosensors)* فيقوم الأنزيم (وهو عادة أنزيم الأوكسيدوريدكتاز)[16] مقام "المحَدِّد" الذي يساعد في عملية تمييز المادة المحلَّلة. يجري بعد ذلك تحويل هذا التفاعل الحيوي المتبادل، بواسطة مكوِّنٍ محولٍ للطاقة "transducer"، إلى إشارة كهربائية يمكن تضخيمها ومعالجتها إلكترونياً (الشكل 2.21). لقد تم تطوير عدد من القصاصات الاختبارية التجارية والمستشعرات الحيوية من أجل استخدامها في الكيمياء الطبية، وخاصة لقياس السكر لدى مرضى السكري.



الشكل 1.21: مثال لنظام معايرة أنزيمية مقترنة باستخدام أنزيم مؤشر: معايرة الغلوكوز بوجود أنزيم الهيكزوكايناز و أنزيم ديهايدروجيناز الغلوكوز-6-فوسفات. يتضمن تحديد الغلوكوز تحفيز فسفرته بواسطة أنزيم الهيكزوكايناز (المستخرج من الخميرة) من خلال تفاعل مساعد (إضافي) لا يمكن كشفه مباشرة. اقترن هذا التفاعل بتفاعل أكسدة الغلوكوز-6-فوسفات إلى 6-فوسفوغلوكونات بواسطة أنزيم ديهايدروجيناز 6-فوسفات (G6PDH). في

---

[15] الرابط غير التشاركي أو تساهمي (non-covalent bond): هو الرابط الذي يمكن أن ينحل.

[16] الأوكسيدوريدكتاز oxidoreducase: هو أنزيم الأكسدة والاختزال.

هذا التفاعل الثاني "المؤشر" اختُزِل mole 1 من NADP+ لكل mole من الغلوكوز 6- فوسفات وهو ما يعادل تكافؤياً الغلوكوز الموجود في العينة الأصلية، ليعطي (أي التفاعل الثاني) NADPH التي يمكن تحديدها بواسطة مقياس الطيف عند طول موجة 340nm . إن الهيكزوكايناز هو أنزيم غير نوعي يمكنه فسفرة العديد من مركبات الهيكسزوز (السكر السداسي) ولكن، بما أن أنزيم ديهايدروجيناز 6-فوسفات (G6PDH) هو أنزيم متخصص تحديداً بالغلوكوز- 6-فوسفات، ولا يقبل أي سكريات مفسفرة أخرى، فإن نظام التفاعل المذكور يبقى نوعياً في معايرة الغلوكوز حتى بوجود كربوهيدرات أخرى.

2.2.21 الأنزيمات كأدوات للاستخدام في التحليل الكيميائي الحيوي
Enzymes as tools in biochemical analysis

تستخدم الأنزيمات المنقّاة بشكل واسع من أجل حل المشاكل التحليلية خارج نطاق طواقم التشخيص الطبية وتحليل الأغذية، مثلاً في مجال البيولوجيا الجزيئية وتقانة الجينات، وكذلك في تحليل البروتينات والاشتقاق الغلايكوجي المتّحد Glycoconjugate.

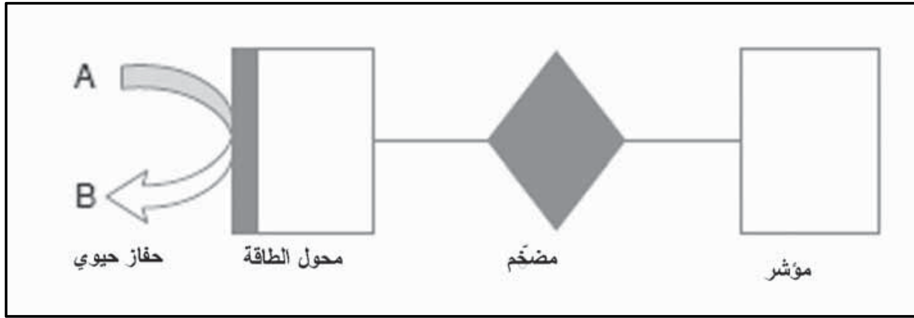
في مجال *علم الأحياء الجزيئي*، تستخدم الأنزيمات كأدوات في التحليل الجزيئي للصبغيات وبنية الجينوم، ومن أجل توصيف الخلل الجيني على مستوى الــ DNA، وتصنيف الفيروسات والكائنات الأخرى وذلك من خلال إقامة علاقة بين الأنماط المميزة لقطعة الــ DNA، وأيضاً من أجل إيضاح العلاقات العرقية (Phylogenetic relationships). إن أنزيمات تعديل الــ DNA والــ RNA، وكذلك أنزيمات البوليميراز (مثلاً أنزيم بوليميراز الــ DNA) هي كلها أدوات ضرورية لتقانات الكَلْوَنَة، كما هو مشروح في الفصلين الرابع والخامس.

إن الأنزيمات عالية النقاوة هي أدوات هامة أيضاً في *تحليل بنية البروتينات والتعديلات التي تطرأ عليها*. تستخدم أنزيمات بروتياز نوعية في تشظي (تكسر) وتحديد بصمة البروتينات، وكذلك في سَلْسَلَتها من جهة النهاية الكربوكسيلية. وعلى غرار ذلك، تستخدم مجموعة من أنزيمات الغليكوهايدرولاز[17] لتحليل أو تعديل، بنية ثمالة الكربوهيدرات الداخلة في تركيب البروتينات السكرية.

[17] الغلايكوهايدرولاز glycohydrolase: أنزيم يضيف جزيء ماء على الغلايكوجين

الجدول 2.21: بعض الأنزيمات المستخدمة في التحليل الكيميائي الحيوي

الأنزيم (مصدره)	الاستخدام
البروتياز (Protease) التريبسين (بقري) كيموتريبسين (بقري) إندوبروتيناز C−lys من بكتيريا *Lysobacter enzymogenes* إندوبروتيناز C−glu (V-8 بروتياز) من بكتيريا *Staphylococcus aureus* V8	تجزئة البروتينات من أجل تحليل ترتيبها التسلسلي، أو تحديد بصمة الببتيدات، أو التحليل البروتيني المحدود للأنزيمات أو مستقبلات من أجل دراسة العلاقة بين البنية والوظيفة
أنزيمات الكربوكسي بيبتيداز A، B، C،Y	سلسلة النهاية الكربوكسيلية للبروتينات
أنزيمات بروتياز المحددة للاقتطاع عامل Xa (بقري أو بشري) إنتيروكايناز (بقري) بروتياز الإميونوغلوبيولين lgA من البكتيريا *Neisseria gonorrhoea*	معالجة بروتينات الاندماج المأشوبة
أنزيمات الغلايكوسيداز إندوغلايكوسيداز D و O−غليكوسيداز من بكتيريا *Diplococcus pneumoniae* إندوغلايكوسيداز F و N−غلايكوسيداز F من *Flavobacterium meningosepticum* إندوغلايكوسيداز H من بكتيريا *Streptomyces plicatus* العديد من أنزيمات إكسو غلايكوسيداز	تحليل الكربوهيدرات والغلايكوبروتين



الشكل 2.21: المفهوم العام للمستشعر الحيوي. يقوم الحفاز الحيوي يتحويل المادة الأولية إلى منتج يتزامن معه حدوث تغير في معيار فيزولوجي كيميائي (مثلاً الحرارة، أو انتقال الإلكترون، أو الضوء، أو تدفق أيوني أو بروتوني إلخ)، بدوره يُحوَّل هذا المنتج إلى إشارة كهربائية من قبل محول الطاقة، ثم يجري تضخيمها ومعالجتها بواسطة كاشف (Detector).

3.2.21 متطلبات خاصة للأنزيمات التحليلية

Special requirements for analytical enzymes

ينبغي أن تحقق الأنزيمات التي ستستخدم في التطبيقات التحليلية عدداً من معايير الجودة تتعلق بـــ:

- *النوعية (التخصص)*: أي غياب الفعالية الأنزيمية الجانبية تجاه مواد أخرى غير المادة الأولية الأساسية التي يمكن أن تتواجد في العيّنة أو مزيج التفاعل؛
- *النقاوة*: أي غياب أي فعالية أنزيمية ملَوِّثة، أو أي ملوثات أخرى تتداخل مع أداء أنظمة التحليل والكشف (ولكن، واعتماداً على الاستخدام المنشود، لا تعني النقاوة بالضرورة غياب بروتينات أخرى غير فعالة)؛
- *الثباتية*: أي الاستقرار في مزيج التفاعل، وكذلك أثناء التخزين الطويل الأمد؛
- *الخصائص الحركية*: أن تمتلك قيماً مناسبة لكلٍّ من ثابت سرعة فعالية الأنزيم النصفية K_m وثابت التحفيز K_{cat} وأن لا يكون هناك أي تثبيط لنشاط الأنزيم ناجم عن مواد موجودة في العيّنة

- *رقم هيدروجيني pH أمثل*: مناسب للشروط التجريبية المطلوبة؛
- *الانحلالية وخواص السطح*: حيث لا يوجد أي تداخل ناجم عن تأثيرات الادمصاص أو التكتل؛
- *الكلفة.*

تعتمد هذه المعايير على بعضها البعض. لذلك يجب أمثلة اختيار الأنزيم وجودته في كل حالة، مع الأخذ بعين الاعتبار التطبيق التحليلي الدقيق.

3.21 البروتينات العلاجية Therapeutic protons

تشكل البروتينات جزءاً من الأدوية التقليدية العديدة، كسُمّ الأفعى وسُمّ النحل والمستحضرات الأنزيمية؛ ولكن، في معظم الحالات تكون محتويات هذه الخلائط غير محددة. وقد استُخدمت منذ زمن طويل البروتينات الطبيعية المأخوذة من الحيوانات، أوالنباتات، أو الكائنات المجهرية، أو كذلك من جسم الإنسان (من الدم، أو البول، أو المشيمة أو الفص الأمامي للغدة النخامية (Adenohypophysis) كمركبات دوائية. وكأمثلة نموذجية على ذلك نذكر الأنسولين المأخوذ من الخنزير، وعوامل تخثر االدم VIII و IX المأخوذة من دم الإنسان جرّاء فصل مكوناته، والبنكرياتين كمساعد للهضم، أو أنزيمات البروتيياز: أنكرود (Ancrod) وباتروكسوبين (Batroxobin) المأخوذين من سمّ الأفعى. إلا أن البروتينات الغريبة هي مستمنعات (تثير الاستجابة المناعية) لدى الإنسان، مما قد يؤدي إلى تعطيل سريع لهذه البروتينات ومنع استعمالها مكرراً في الدواء الذي يؤخذ عن طريق غير الفم. كما أن عزل البروتينات العلاجية من سوائل وأنسجة جسم الإنسان (والحيوان) يشكل مصدراً خطراً لاحتمال التلوث الفيروسي الذي قد يقود إلى خطر إصابة المرضى بأمراض أخرى، مثل الإصابة بفيروس مرض نقص المناعة المكتسب (HIV).

إن تركيز البروتينات الفعالة وظيفياً في سوائل جسم الإنسان وأعضائه منخفض جداً، مما يحتم ضرورة معالجة كمية كبيرة من المادة للحصول على كمية قليلة من المنتج الفعال. والتصنيع الكيميائي للبروتينات، بالرغم من أنه ممكن

مبدئياً، إلا أنه ليس طريقة قابلة للتطبيق اقتصادياً لإنتاج الأدوية البروتينية. لذلك، لم يصبح بالإمكان إنتاج البروتينات البشرية بكميات كبيرة ونقاوة عالية إلا من خلال تكنولوجيا الجينات. ففي العديد من حالات العلاج، كان استخدام البروتينات البشرية المأشوبة أول من أتاح المجال للعلاج المدروس باستخدام مواد الجسد نفسها، وذلك اعتماداً على المعرفة بأسباب المرض وآلياته البيولوجية. فالبروتينات العلاجية من أمثال الهرمونات، وعوامل النمو والتمايز تعمل في عمليات التأشير، في حين أن بروتينات أخرى تعمل كحفازات حيوية (الأنزيمات) أو مثبطات أو مستجيبات للجهاز المناعي (الأجسام المضادة). لذلك، تستخدم هذه البروتينات من أجل استبدال، أو تضخيم أو تثبيط العمليات الوظيفية.

حالياً، يستخدم أكثر من 100 بروتين مأشوب في العلاج (يعرض الجدول 3.21 مجموعة مختارة منها)، في حين أن هناك أكثر من 500 بروتين آخَر ما زالوا في مراحل تطوير مختلفة. ومن بين الأدوية الأكثر نجاحاً والتي تصنف ضمن "أفضل 20" دواءً على قائمة مبيعات المستحضرات الدوائية عالمياً، بروتينات الإريثروبيوتين (Erythropoietin) (EPO)، والأنسولين، والسوماتوتروبين (Somatotropin) (هرمون نمو لدى الإنسان)، والعامل المحفز لتشكل مستعمرات الكريات البيض الحبيبية Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)، والأنترفيرون–ألفا (α-interferon) وعدد من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة. ولا تزال السوق العالمية للمستحضرات الدوائية القائمة على تكنولوجيا الجينات مستمرة في النمو، وبوتيرة سريعة.

1.3.21 اختيار نظام التعبير Choise of expression system

البكتيريا، والخميرة، وخلايا الحشرات والثدييات هي أكثر المضيفات استخداماً للتعبير عن البروتينات المختلفة الأصل. فيما يلي نقدم نظرة عامة مختصرة حول ميزات ومساوئ الأنظمة المضيفة، وبشكل خاص حول تلك الأنظمة المستخدمة للتعبير عن البروتينات العلاجية.

خلايا الثدييات Mammalian cells

يمكن في خلايا الثدييات المضيفة، مثل خلايا مبيض الهمستر الصيني Chinese hamster ovary (CHO)، أو خلايا كِلى طفل الهمستر Baby hamster kidney (BHK)، أو خلايا الفأر السرطانية (مثل خلايا NS0، SP/0) إحراز مستوى عالٍ (حتى 100 pg في اليوم لكل خلية مضيفة) من التعبير عن بروتينات مأشوبة (انظر الفصل الثاني والعشرين). تفرز البروتينات عادةً في وسط التخمير مطوية (ملتفة) بالشكل الصحيح، وفعّالة، وفي معظم الحالات، يجري عليها عمليات الارتباط بالغليكوزيل (Glycosylation) وتعديلات ما بعد الترجمة الأخرى، "بطريقة مشابهة نوعاً ما لما يجري عند الإنسان"، مع وجود فروقات طفيفة يمكن أن تؤثر في استمناع البروتين المتشكل. ولكن، قد يتطلب تطوير خط مستقر من الخلايا التي تعبّر بمستوى عالٍ عن بروتين علاجي عدة دورات من التضخيم، والتي تأخذ أشهراً عدة، بالإضافة إلى كلفة تصنيع مرتفعة. تُستخدم تقانة التخمير مع خلايا ثدييات مضيفة من أجل إنتاج الجزء الأكبر من المستحضرات الدوائية الحيوية المرخصة، كما أنها النظام الأمثل لإنتاج البروتينات المعدلة مثل البروتينات المرتبطة بالغليكوزيل، والبروتينات العلاجية على مستوى ضخم، خاصة إذا كان إجراء التعديل الصحيح للبروتين أساسيٌّ لامتلاك هذا البروتين تأثيره العلاجي.

خلايا الإنسان Human cells

إحدى الطرق التي تضمن تطابق هوية البروتين المنتج بالتأشيب مع بروتين الإنسان الأصلي هي استخدام خطوط خلوية من الإنسان كنظام تعبير جيني. وبدلاً من كلونة الجين أوتسلسل الــ DNA الذي يُشفر للبروتين المنشود داخل خلية المضيف، فإنه بالإمكان التلاعب بمحضض الجين بدلاً من الجين نفسه، وذلك من أجل تفعيل التعبير عن جين الإنسان الموجودة في الخلية أساساً. وفي النهاية يمكن أن تغدو "تكنولوجيا تفعيل الجين" هذه، طريقة ذات ميزات تجارية من أجل إنتاج البروتينات العلاجية.

من الممكن إدخال الجين المُشفر لبروتين مأشوب داخل جينوم الفيروس العَصَوي (Baculovirus)، الذي يصيب خلايا الحشرات بفعالية عالية (انظر الفصل الثاني والعشرين) ويستخدم آلية تصنيع البروتين لديها، من أجل إنتاج كميات كبيرة من البروتين (حتى 500 mg من البروتين لكل ليتر من وسط الزراعة). لذلك، يُعتبر هذا النظام مناسباً جداً للحصول، وبسرعة على كميات صغيرة من البروتين من أجل استخدامها في دراسات قبل سريرية. ولكن بسبب اختلاف نظام معالجات ما بعد الترجمة في هذه الخلايا عمّا عند الثدييات، فإن هذا النظام غير مناسب لإنتاج كميات كبيرة من البروتينات.

الجدول 3.21: مجموعة مختارة من الأدوية البروتينية المأشوبة [أ]، [ب]

السيتوكينات ومضاداتها	الهرمونات والببتيدات	عوامل التخثر والمثبطات	الأنزيمات	اللقاحات	بروتينات الاندماج
الإنترفيرون ألفا–a2	الإنسولين	إيبتاكوغ ألفا (Eptacog alpha)	التيبلاز (t- PA)	لقاح التهاب الكبد	**دينليوكين ديفتيتوكس** (Denileukin diftitox)
الإنترفيرون ألفا–b2	**إنسولين ليسبرو**	**عامل مضاد الناعور**	**ريتابلاز (ميوتين-t) PA**	لقاح داء لايم[ج]	**إيتانيرسيبت** (Etanercept)
إنترفيرون ألفاكون–1	أسبارت الإنسولين	**موروكتوكوغ ألفا (FVIII– ميوتين)**	**تينيكتيبلاز (ميوتين-t) PA**	لقاح الدفتيريا/الكزاز / السعال الديكي	**أليفاسيبت (Alfacept)**
بيك إنترفيرون ألفا–a2	**إنسولين غلارجين**	نوناكوغ ألفا	**مونتيبلاس (ميوتين-t) PA**	لقاح الفيروسة العجلية[د]	
بيك إنترفيرون ألفا–b2	إيبويتين–ألفا	ديزيرودين	دورناز –ألفا (RNase)		
إنترفيرون بيتا– aI	إيبويتين–بيتا	**ليبيرودين**	**إميغلوسيراز**		
إنترفيرون بيتا– bI	إيبويتين–دلتا	دروتريكوجين –ألفا (مع تفعيل بروتين C)	أغالسيداز ألفا		

إنترفيرون غاما- bI	**داربيبويتين-ألفا**	مثبط أنزيم ألفا1-بروتيناز	أغالسيداز بيتا
ألديسليوكين (LI-2)	فوليتروبين ألفا		رازبيريكاز
فيلغراستيم (-CSF-G)	فوليتروبين بيتا		لارونيداز
بيغفيلغراستيم	غلوكاغون		
لينوغراستيم-G) CSF)	سوماتروبين		
مولغراموستيم (GM-CSF)	لوتروبي- ألفا		
سارغراموستين (GM-CSF)	**تيريباراتايد (34-I PTH)**		
تاسونيرمين (TNF-α)	كالسيتونين سمك السلمون		
بيكابليرمين (PDGF-BB)	ثيروتروبين-ألفا		
أوبريفيكين (IL-II)	كوريوغونادوتروبين A2		
أناكينرا (IL-IRA)	أوستيوجينيك بروتين-I ديبوتيرمين ألفا (BMP-2) **بيغفيزومانت (عامل تضادي hGH)** نيزيريتايد (بيبتايد مُدِر للصوديوم)		

(أ) أشير إلى البروتينات المستخدمة بشكلٍ معدل (مقارنة بالأشكال الأصلية لبروتينات الإنسان) بكتابتها بالبنط العريض.

(ب) يُسوَّق العديد من البروتينات المذكورة في الجدول كماركات متنوعة لنفس شركات الأدوية أو من قبل شركات مختلفة. راجع مواقع الشركات المصنعة على الإنترنت من أجل التفاصيل المتعلقة ببروتين محدد.

(ج) داء لايم: وهو مرض بكتيري إلتهابي خطير ينتقل عن طريق قراد الغزال ويتميز بطفح جلدي، تورم وحمى، وألم في الرأس وأعراض مشابهة للروماتيزم.

(د) الفيروسة العجلية: نوع من فيروسات الــ RNA يسبب التهاب أمعاء لدى الرضّع، إسهال حاد لدى الأطفال والحيوانات.

الخميرة Yeast

إن الخميرة وفطور أخرى (مثل *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris*) هي: كائنات مجهرية حقيقية النوى (Eukaryotic) يتم زرعها بشكل روتيني على مستوى ضخم. عادة ما تكون البروتينات المأشوبة موجودة داخل خلية الخميرة؛ غير أنه يمكن أيضاً إضافة سلسلة مرشد (Leader) من أجل الحثّ على إفراز البروتين (انظر الفصل الخامس). وفي حين أن البروتينات المتغايرة (مختلفة الأصل) من الممكن أن تتراكم داخل الخلية إلى مستوى الغرام في الليتر، فإن البروتينات المفرزة عادة ما تكون تراكيزها ما بين 10 إلى 100 ميلليغرام في الليتر فقط. تُطوى بروتينات الإنسان التي جرى التعبير عنها في الخميرة بشكل صحيح مع احتوائها على جسر ثنائي الكبريت، ولكن عملية الارتباط بالغليكوسيل تختلف بشكل كبير عن نموذج مثيلتها عند الإنسان. وحالياً، يوجد في السوق بروتين علاجي وحيد (الإنسولين) الذي يتم إنتاجه بالخميرة.

البكتيريا Bacteria

تقدم أنظمة المضيف البكتيري ميزات أساسية تضمُّ التطور السريع، والفعالية العالية، والإنتاج المنخفض الثمن نسبياً. يمكن أن تتراكم البروتينات المأشوبة المنتجة داخل الخلايا، أو أن تفرز إما في المحيط البلازمي المجاور (بكتيريا *E. Coli*) أو في وسط التخمير (أنواع بكتيريا *Bacillus*). ولكن، معالجات ما بعد الترجمة التي تحصل على بروتينات حقيقيات النوى المعقدة، مثل عمليات الارتباط بالغليكوزيل وتشكل رابطة ثنائية الكبريت، لا تحصل داخل الخلية البكتيرية. كذلك، يمكن أن تختلف النهاية الأمينية للبروتينات التي يجري التعبير عنها داخل الخلية البكتيرية عن الشكل الطبيعي لها من حيث إنها يمكن أن تضم ثمالة فورميل ميثايونين. لذلك من أجل الحصول على النهاية الأمينية الصحيحة، يمكن أن يُعَبَّر عن البروتين المأشوب على شكل بنية اندماجية باستطالة النهاية الأمينية التي يجري بعد ذلك فصلها باستخدام أنزيم بروتياز مناسب. في العديد من

الحالات، يتم اختيار سلسلة هذا الذيل الاندماجي بحيث يمكن استغلاله لتسهيل عملية التنقية. مثلاً، تُعلَّق ذيول من تسلسل ثمالات الهيستيدين– يستخدم عادة ستة وتعرف بـــ ذيول عديدات الهيستيدين Poly (His) tails - إلى البروتين المنشود بحيث يمكن بعد ذلك أن يرتبط نوعياً بمواد كروماتوغرافيا خُلابية معدنية لتنقيته. تتم إضافة ثمالات الهيستيدين من خلال إضافة ستة مشفِّرات إلى الـــ DNA في مكان يلي تسلسل الجين الذي يُشفر للبروتين نفسه؛ وبذلك تكون الخلية نفسها هي من تقوم بصناعة البروتين المعدل.

بالإضافة إلى ذلك، عند التعبير العالي المستوى عن البروتينات داخل الخلايا البكتيرية، سواء كان في العصارة الخلوية أو في المحيط البلازمي، يتراكم العديد من البروتينات على شكل جسيمات متكتلة ملتفة بصورة خاطئة، وغير منحلة (يطلق عليها *الأجسام الضمنية inclusion bodies*)، مما يتوجب تصحيح التفافها في الزجاج من أجل الحصول على شكلها الطبيعي (انظر أيضاً الفقرة 2.3.21). إذا أمكن تصميم عملية إعادة التفاف بحيث تؤمن عطاءاً مناسباً بكلفةٍ جيدة، فإن نظام المضيف البكتيري (وخاصة البكتيريا القولونية الإشريكية *E. Coli*) يكون مناسباً جداً لإنتاج جميع تلك البروتينات العلاجية التي لا تحتاج إلى معالجات ما بعد الترجمة من أجل امتلاكها الفعالية الحيوية في الجسم الحي.

الحيوانات والنباتات المعدّلة وراثياً Transgenic animals and plants

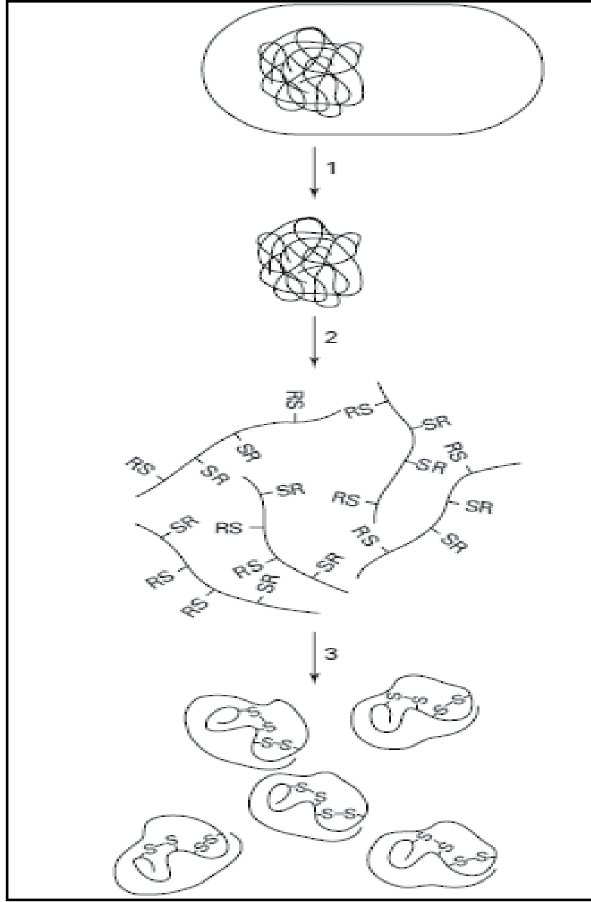
يعني التلاعب الجيني إدخال جين من نوع ما من الكائنات (وهو ما يسمى *بالجين المنقول*) في الخلايا الجنسية لنوع آخر، إما نبات أو حيوان، بحيث تقوم كل الذرية الناتجة من الحيوان أو النبات المعدل (المحوَّر) بصناعة البروتين الجديد الذي تُشفر له هذه الجين. لقد اقترح الحليب والدم، وكذلك البول من أجل إنتاج البروتينات المحورة، بحيث تم إنتاج عدد من البروتينات المختلفة بهذه الطريقة؛ بعض هذه البروتينات، مثل بروتين مضاد التجلط–III Antithrombin-III وبروتين مضاد التريبسين–ألفا1 α1-antitrypsin المنتجين من الحليب يخضعان

حالياً لتجارب ودراسات سريرية. وقد تم تسجيل معدل إنتاج يعادل 35 غراماً من البروتين لكل ليتر من الحليب، مما يشير إلى أن الحيوانات الحلوبة المحوّرة قد تقدم طريقاً فعالاً من الناحية الاقتصادية لإنتاج مواد علاج حيوية (أدوية حيوية) على نطاق واسع. لكن، زمن التطوير في هذه العملية طويل وذلك لأن فترة الحمل وبدء النضج الجنسي لدى الحيوان هما عاملان محددان، إضافة إلى بقاء عدد من المنغِّصات المتعلقة بانسجام عملية إنتاج البروتين من حيوانات مختلفة. وبالرغم من ذلك، تمثل تقانة التحوير تحدياً حقيقياً للتقانة الحيوية الاقتصادية. فهو يقدم ميزات انخفاض كلفة تنمية النباتات على مساحات شاسعة، كما يوفر أعضاء طبيعية لتخزين البروتين، إضافةً إلى توطيد عمليات الحصاد، والنقل، والتخزين، والمعالجة. أما المساوىء الحالية لهذا النظام فتتمثل في انخفاض الكميات المتراكمة من البروتينات المأشوبة، وعدم توفر معلومات كافية حول عمليات مابعد الترجمة التي تجري على البروتينات في النبات، وكذلك محدودية المعرفة بتقانة معالجاتها اللاحقة.

2.3.21 التفاف البروتينات ابتداءً من الأجسام الضمنية

Protein folding from inclusion bodies

غالباً ما تقارن عملية التفاف البروتينات في الزجاج بمهمة إعادة بيضة مسلوقة إلى حالتها قبل عملية السلق- أي استرجاع فعالية البروتين الحيوية وشكله الطبيعي ابتداءً من وجوده في هيئة تكتلات غير منحلة وغير فعالة. تجري عملية *استعادة البروتينات لطبيعتها الأصلية* على عدة مراحل، كما هو موضح في الشكل 3.21. في البروتينات غير الملتفة تكون الأجزاء الكارهة للماء منها مكشوفة بدلاً من كونها مدفونة داخل بنية البروتين المكوَّر. مما يحفز هذا الجزء من السلسلة عديدة الببتيدات على عملية تكتل غير نوعية تؤدي إلى انخفاض في العطاء من البروتين المطوي (الملتف).



الشكل 21.3: استعادة البروتينات شكلها الطبيعي من الأجسام الضمنية. غالباً ما تتشكل البروتينات المأشوبة المُعَبر عنها بشكلٍ مفرط في الخلية البكتيرية كأجسام ضمنية غير منحلة وملتفّة بصورة خاطئة (1). بعد انحلال الخلية، تُجمع الأجسام الضمنية بواسطة الطرد المركزي، ثم يتم غسلها بدارئ لإزالة المكونات الخلوية المذابة (وهذا يقود إلى تنقية البروتين المنشود بنسبة تتجاوز 90%)، وبعدها يُذوَّب في محلول مركز بالمواد القوية في تغيير طبيعة البروتين (مسخ البروتين)، مثلاً 6-8 mol يوريا في الليتر أو 5-6 mol غوانيدينيوم. حمض الهيدروكلوريك في الليتر (2). في حال احتواء البروتين المأشوب على ثمالات السيستيين، يتم اضافة دارئ مساعد لتفاعلات الاختزال والأكسدة، كمزيجٍ الغلوتاثيون بصورتيه المختزلة والمؤكسدة (GSH/GSSG) وذلك لدى رقم هيدروجيني قلوي. في بعض الحالات، تم إثبات استفادة من التعديل القابل للعكس لمجموعة الكبريت المختزلة، مثلاً من خلال تشكيل مزيج من ثنائي الكبريت والغلوتثيون، وذلك لزيادة انحلالية السلسلة الجانبية للببتيد الممسوخ (R). عندئذٍ تُسمح عملية إعادة التفاف للبروتين من خلال الإزالة البطيئة للعامل الماسخ، والتي عادةً تكون

بواسطة التخفيف أو الانفكاك، المصاحب لتكوّن الرواط ثنائية الكبريت (3). غالباً ما يتبين أن زيادة إضافات كالغوانين guanine، أو tris (hydroxymehyl)amino methane، أومشتقات الألكيليوريا alkylurea يؤدي إلى تحسن عطاء إعادة الالتفاف بشكلٍ مُعتبر. (تم تعديل الشكل بإذنٍ من:

F. A. O. Marston، "The Purification of Eukaryotic Polypeptides Synthesized in Escherichia coli," *Biochemistry Journal*, vol. 240 (1986), pp. 1–12. © The Biochemical Society.

لأن التكتل هو تفاعل ثنائي الجزيئات فهو يعتمد على التركيز. لذلك من أجل الحفاظ على طبيعة البروتينات الأصلية فإن ذلك يجب أن يكون عند درجات تخفيف عالية، وهذا ما لا يتناسب من الناحية الاقتصادية لإنتاج البروتينات على نطاق واسع لأن ذلك يتطلب أحجام تفاعل كبيرة مع الإبقاء على تراكيز البروتين منخفضة. ولكن، لقد أُثبت أن البروتين المطوي (الملتف) بشكل صحيح (وبالتالي، محب للماء) لا يؤثر في التفاف القسم الآخر من هذا البروتين الذي لازال غير مكتمل الالتفاف بعد. وبذلك يمكن زيادة التركيز الكلي للبروتين تدريجياً إلى مستويات مرغوبة إقتصادياً إذا ما بدأ التفاف البروتين عند تركيز منخفض، ثم أُضيفت الأقسام الأخرى من هذا البروتين غير الملتفة بشكل متواصل أو متقطع إلى نفس المزيج فقط بعد أن تكون الكمية المضافة من البداية قد أخذت شكلها الصحيح. تُستخدم هذه العملية التي تعرف بـــ "الحفاظ على الشكل الطبيعي بأسلوب نبضي" تجارياً في إنتاج مفعلات بلازمينوجينية ميوتيني (مُطْفَر).

3.3.21 استعمال البروتينات العلاجية، وتوصيلها واستهدافها

Application, delivery and targeting of therapeutic proteins

بشكل عام، وبسبب خصائصها النموذجية، لا يمكن بأي طريقة اعتبار البروتينات عوامل علاجية "مثالية" لأسباب تتعلق بثباتيتها، استعمالها واستمناعها الكامن.

الثباتية Stability

البروتينات هي عديدات ببتيدية، ولذلك، هي حساسة للتسخين أو عندما تتعرض لقيم متطرفة من الرقم الهيدروجيني pH. يمكن للبروتينات أيضاً أن تتفكك حيوياً بسهولة، ما يؤدي إلى فترة صلاحية محدودة لها، بالإضافة إلى عمر نصفي قصير داخل جسم الإنسان، مثلاً بسبب التحلل البروتيني في المعدة والأمعاء وبسبب عملية التخلص منها بمستقبلات خاصة من الدم والتي يتبعها تحطيم *بالتحليل البروتيني* في الكبد. وبالإضافة إلى خطر تحللها، فإنه يمكن أن يطرأ تعديل (مثل الأكسدة أو تشكل رابطة أيزوببيتيدية) على سلاسل أحماضها الأمينية الجانبية أثناء تخزينها أيضاً. من الممكن تحسين فترة صلاحية العقاقير البروتينية عن طريق المضافات المناسبة مثل السكر أو الأحماض الأمينية، إلا أن محاولات إطالة نصف عمرها الحيوي داخل الجسم لاقت حتى الآن نجاحاً محدوداً، وأهمها كان متمثلاً بالتعديل الكيميائي عن طريق ربط البروتين بمتعدد الإيثيلين غلايكول. يبدو أن حفظ البروتين داخل تغليفات دقيقة بوليميرية قابلة للتحلل الحيوي، التي غالباً ما تكون بولمر متعدد الأكتايد مع بولمر متعدد الغلايكولايد، يقدم مقاربة جديدة في هذا المجال مثيرة للاهتمام. إذ من الممكن منع التفكك الناجم عن التحلل البروتيني في المعدة عن طريق التغلُّف، مما يكسب البروتين مقاومة ضد الحموضة وأنزيمات البروتياز في الجهاز الهضمي.

طرق الاستعمال Ways of application

إن السطح الجزيئي للبروتينات المنحلة محب للماء. لذلك، وكقاعدة، لا يمكن للبروتينات العبور من خلال الأغشية البيولوجية فهي لن تدخل الأنسجة من خلال الجدار المعوي أو الخلايا من خلال مجرى الدم. لذلك، سوف يكون التوافر الحيوي للأدوية البروتينية غير كافٍ في الجسم، إلا إذا كان هدف البروتين هو تجويف الفم نفسه (كما في حالة الليزوزومات، مثلاً، التي تستخدم لتثبيط الإصابات البكتيرية في الفم)، أو الجهاز الهضمي (مثلاً أنزيمات اللبياز والأميلاز، التي تساعد على هضم الغذاء). وهكذا، لا يمكن إعطاء الأدوية البروتينية عن طريق الفم، ولكن يجب أن تحقن أو تتسرب عن طريق الوريد إلى مجرى الدم. وهناك

توجهات جديدة واعدة تقترح تناول الأدوية البروتينية (مثلاً الأنسولين) بواسطة المسار الرئوي (أي بواسطة الاستنشاق المباشر) .

استمناع البروتينات الغريبة

Immunogenicity of foreign proteins

تثير البروتينات الغريبة على جسم الإنسان رد الفعل المناعي (أي أنها مستمنعة). فعندما تحقن في مجرى الدم، تحفز تشكل الأجسام المضادة واستجابة الخلايا المناعية. كما يمكن أن تحتوي البروتينات المأخوذة من مصادر طبيعية على ملوثات مستمنعة، مما قد يمنع الاستخدام المتكرر أو المديد لنفس الدواء البروتيني (في حين أن الاستمناع أمر مرغوب عندما تستخدم البروتينات كلقاح).

إحدى الطرائق المتبعة لتخفيض استمناع البروتينات (وفي نفس الوقت إطالة نصف عمرها في الجسم) هو ربطها كيميائياً ببولمرات منحلة في الماء، وبصورةٍ خاصة بمتعدد الإيثيلين غليكول PEG. مثل هذه البروتينات التي تدعى "Peglated proteins" تُستخدم كمركبات علاجية؛ فعلى سبيل المثال، يُستخدم كلٌّ من أنزيم الأدينوزين دي أميناز والألفا– إنترفيرون والفيلغراستيم المربوط بمتعدد الإيثيلين غلايكول PEG-adinosine deaminase (PEG-ADA), PEG-interferon-α pegfilgrastine (peglated G-CSF) لعلاج نقص الأدينوزين دي أميناز، والإصابات الفيروسية، وقلة الكريات البيضاء على التتالي.

4.3.21 أمثلة على البروتينات العلاجية

Examples of therapeutic proteins

إن "الجيل الأول" من البروتينات العلاجية المأشوبة التي تتألف من تسلسل أحماض أمينية مطابقة للبروتينات البشرية الطبيعية، هي أدوية بروتينة مصنعة من خلال الاستعانة بتقانة الجينات. من الممكن الآن تعديل تسلسلات الـــ DNA المُشفرة للبروتينات بواسطة التطفير الموجه في الموقع، (Site directed mutagenesis) حيث يمكن تصميم البنية الأساسية (الأولية) للبروتينات المأشوبة، كما هو مرغوب،

وهو ما يعرف *بهندسة البروتينات*. تُدعى البروتينات المطفَّرة بهذه الطريقة *ميوتينات (Muteins)*. وتنحصر التغيرات في ثمالات أحماض أمينية محددة (تطفير موضعي)، لكنها يمكن أن تشمل أيضاً حذف أو إدخال تسلسلات أكبر، كما يمكن أن يجري ربط ثمالات أحماض أمينية لبروتينين مختلفين (التي تعرف باسم *اندماجات بروتينية*). تقدم هذه التقانات مقاربة استراتيجية لقضية تعديل خصائص البروتين بطريقة منطقية، مثل الثباتية، أو الانحلالية، أو النوعية في ارتباط المستقبِل ومادته الأولية، أو الوظائف المؤثرة أو الحركيات الدوائية (Pharmacokinetics). لقد وُصفت الميوتينات التي تم الحصول عليها وفقاً لهذا التصميم المنطقي بأنها "الجيل الثاني" من البروتينات العلاجية.

لا تزال المعرفة الحالية المتوفرة عن العلاقة بين البنية والوظيفة في البروتينات غير مكتملة، ولم يكن ممكناً التنبؤ بتأثير التغيرات للتسلسل البروتيني في خصائصه الملحوظة إلا في بعض الحالات البسيطة. على الرغم من ذلك، في العديد من الحالات تم تصميم بروتينات مأشوبة بنجاح من أجل استخدامها كعوامل علاجية، فهناك حوالى نصف الأدوية الحيوية المسوَّقة حالياً تحتوي على بروتينات مهندسة تلعب دور المكون العلاجي الفعال في هذه الأدوية.

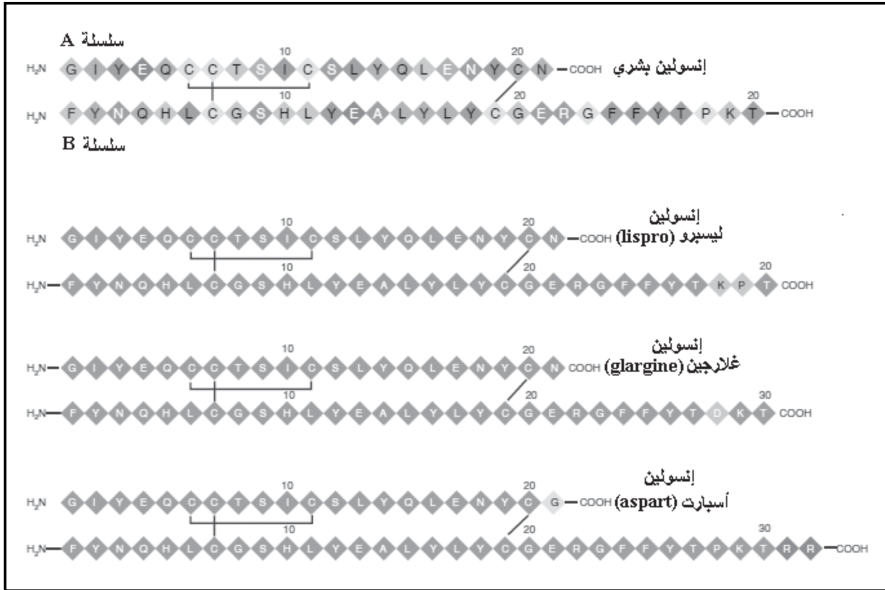
ونعرض فيما يلي بعض الأمثلة على "الجيل الأول" و"الجيل الثاني" من الأدوية البروتينية

الإنسولين Insulin

الإنسولين هو هرمون بنكرياسي يستخدم لعلاج داء السكري من النوع 1 منذ العام 1922 وذلك بسبب تأثيره في تخفيض مستويات الغلوكوز في الدم. يتألف الإنسولين من سلسلتين عديدات الببتيد ترتبط مع بعضها البعض بروابط كبريتية ثنائية. تمتلك السلسلة A إحدى وعشرين ثمالة حمضٍ أميني، كما تمتلك السلسلة B ثلاثين ثمالة حمض أميني. يتضمن التصنيع الحيوي للإنسولين معالجة بالتحليل البروتيني الذي يُطبَّق على الجزيء السالف وحيد السلسلة، بادئة الإنسولين، ما يؤدي إلى تحرير الببتيد (-C) الرابط بين السلسلتين، كما هو موضح في الشكل 4.21.

خلال العقود الأولى من العلاج بالإنسولين، استخدم إنسولين البقر أو الخنازير الذي يحتوي على بعض الثمالات في سلسة الأحماض الأمينية المختلفة عن الإنسولين البشري، مما قد يقود إلى تشكيل أجسام مضادة للإنسولين في حال استعماله المديد. في السبعينيات من القرن الماضي، تم إنتاج إنسولين مطابق لجزيء الإنسولين البشري من خلال استبدال ثمالة الألانين في الموقع 30 من السلسلة B من إنسولين الخنزير بثمالة الثريونين، وذلك بواسطة عملية شبه تصنيعية محفزة بأنزيمات البروتياز. ولكن، بسبب العدد المتنامي من المرضى الذين يحتاجون الإنسولين (حوالى 1 من كل 1000) كان هناك قلق من محدودية التزويد بإنسولين الخنزير، إلى أن جرى الآن استبداله هو والمادة البشرية شبه المصنعة المشتقة منه بالإنتاج المأشوب للإنسولين البشري.

الشكل 4.21: التصنيع الحيوي وتسلسل الأحماض الأمينية لبادئة الإنسولين والإنسولين لدى الإنسان. ينزع التشطر بالتحلل البروتيني الببتيد الرابط connecting C- من الجزيء السالف وحيد السلسلة، أي بادئة الأنسولين، لإطلاق إنسولين فعّال مؤلّفٍ من سلسلتين متصلتين بروابط ثنائية الكبريت.



الشكل 5.21: مشتقات إنسولين سريعة وطويلة الأثر. مقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية في الإنسولين البشري؛ ميتينات الإنسولين السريعة الأثر، إنسولين ليسبرو، وأسبارت؛ مشابه الإنسولين طويل الأثر، إنسولين غلارجين.

لقد طُوّرت عدة استراتيجيات لإنتاج الإنسولين المأشوب. ففي العملية الأساسية كما وُصفت من قِبل الشركة المنتجة، جينينتك المتحدة (Genentech Inc.)، يُعبَّر عن السلسلتين A و B بشكل منفصل داخل البكتيريا القولونية الإشيريكية كبروتينات مندمجة إما مع أنزيم سينثتاز التريبتوفان أو أنزيم الغالاكتوسيداز. مما يسمح بالتعرف بسهولة على السلسلتين A و B واسترجاعهما من مزرعتين منفصلتين. عندئذ، وبعد المعالجة عن طريق الشطر ببروميد السيانوجين (Cyanogen bromide)، يجري ربط السلسلتين ببعضهما البعض بواسطة إعادة التأكسد الكيميائي. أما في عمليات بديلة أخرى، فيتم التعبير في البكتيريا القولونية الإشريكية أو الخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*) عن الوسيط المصنع حيوياً الفيزيولجي (الوظيفي)، أي بادئة الإنسولين، أو مشابهاتها التي تضم تسلسلات ببتيدية قصيرة رابطة، بحيث يُزال الببتيد الرابط بعد ذلك عن طريق الاستئصال بالتحليل البروتيني.

إن ارتفاع تركيز الإنسولين في الدم بعد حقن مريض السكري به هو بطيء، لذلك يجب إعطاء الحقنة قبل 15 دقيقة من وجبة الطعام. وبالمثل، إن انخفاض مستوى الإنسولين في الدم هو أيضاً بطيء أكثر مما هو مطلوب وظيفياً، لذلك هناك خطر من زيادة مستوى الإنسولين في الدم. إن الزيادة البطيئة في التركيز ناشئة عن الوقت اللازم لتفكك الشكل السداسي إلى الشكل الثنائي أو الأحادي الفعال دوائياً. وبغية التسريع في هذه العملية، جرى بناء عدد كبير من ميوتينات الإنسولين الفعالة حيوياً حيث إن الأشكال السداسية منها تبدي تفككاً اسرع في المحلول. ومن بين مشابهات الإنسولين سريعة التأثير هذه (الشكل 5.21): *ليزبرو إنسولين (Insulin lispro)*، الذي يحاكي الجزيء المثيل بالإنسولين المتواجد طبيعياً وهو عامل النمو-1 الشبيه بالإنسولين (Insulin-like growth factor-I (IGF-I))، من خلال تبديل ترتيب ثمالات الأحماض الأمينية B28 وB29؛ و *أسبارت إنسولين Insulin aspart*، الذي يحتوي على الأسبارجين في الموقع B28 بدلاً من البرولين. لذلك يحقق هذان الشكلان من ميوتينات الإنسولين مستويات فعّالة دوائياً بشكل أسرع، لأن التغيرات التي يضمّانها تقلل من اتحادهما الذاتي، وهكذا من الممكن حقنها مباشرة قبل وجبة الطعام. من جهة أخرى، تم تطوير *الإنسولين غلارجين (Insulin glargine)* (وهو ميوتين الإنسولين استُبدل فيه الأسبارجين في الموقع A21 بالغلايسين، كما أضيف إليه ثمالتي أرجينين إضافيتين إلى النهاية الكربوكسيلية للسلسلة B) كمشابه للإنسولين طويل الأثر: وهو مستحضر في هيئة محلول على رقم هيدروجيني pH 4، وعندما يحقن تحت الجلد يترسب بسبب التغير في الرقم الهيدروجيني فيشكل مترسباً بطيء الانحلال. مما يؤدي إلى معدل ثابت نسبياً من امتصاص الإنسولين على مدى 24 ساعة.

الإنترفيرونات Interferons

الإنترفيرونات هي أول صنف من السيتوكينات تم اكتشافه، وهي تتألف من مجموعة بروتينات تبدي طيفاً واسعاً من التأثيرات البيولوجية، بما فيها التدخل في تضاعف الفيروسات، وتنظيم الوظيفة المناعية، وتنظيم النمو والتمايز. يمكن تمييز ثلاث عائلات من الإنترفيرون عند الإنسان هي الإنترفيرون ألفا، وبيتا، وغاما.

الإنترفيرون– ألفا Interferon – α

يعرف لدى الإنسان، على الأقل 24 جيناً، أو جيناً كاذباً للإنترفيرون–ألفا (IFN-α). وتضم الأشكال التجارية المأشوبة الأنترفيرون IFN-α2a و IFN-α2b، وكلاهما يضم 165 ثمالة حمض أميني، بالإضافة إلى "إنترفيرون متفق عليه" consensus interferon (IFN alfacon-1)، وهو شكل مصنّع من الأنترفيرون (166 ثمالة حمض أميني) تم استنباط تسلسل أحماضه الأمينية عن طريق مقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية بعدة نُمَيطات (sub-types) من الإنترفيرونات الموجودة طبيعياً، ووضع ثمالات الأحماض الأمينية الأكثر تكراراً لموقعها في سلسلة الأحماض الأمينية. يمتلك الإنترفيرون–ألفا خصائص مضادة للفيروسات، ومضادة لتكاثر الخلايا، ومعدِّلات مناعية، ولذلك، فهو يُستخدم لعلاج الأمراض الفيروسية (مثلاً التهاب الكبد من النوع C)، بالإضافة إلى أنواعٍ عديدة من السرطان (مثلاً لوكيميا المُشَعَّرة الخلايا)، وساركومة كابوسي المرافقة لمتلازمة نقص المناعة المكتسبة (AIDS-associated Kaposi sarcoma). كما أدخلت حديثاً أشكال إنتفيرون مقترنة بالبولي إيثيلين غلايكول (PEG-INF).

الإنترفيرون– بيتا Interferon – β

يفرز عادة من قبل الأرومات الليفية Fibroblast، وهو يبدي تشابهاً كبيراً في تسلسل الأحماض الأمينية مع الإنترفيرون– ألفا، فهو يتألف أيضاً من 166 ثمالة حمض أميني، ويبدي تأثيرات مضادة للفيروسات وللتكاثر، كما أبدى فعالية في علاج التصلب اللويحي المتعدد الناكس المتراخي (Relapsing-remitting (Ms)). يُنتَج اثنان من بين منتجات الأنترفيرون–بيتا (IFN-β) الثلاثة المرخصة حالياً في خطوط خلوية من مبايض الهامستر الصيني، ويُنتج الثالث في خلايا مأشوبة من البكتيرة القولونية الإشريكية؛ يختلف هذا الأخير عن الإنترفيرون المكافيء لدى الإنسان بثمالة السيستين في الموقع 17 المستبدلة بالسيرين. إن الآلية الدقيقة لفعالية الإنترفيرون– بيتا في علاج التصلب اللويحي لا تزال غير معروفة.

الإنترفيرون–غاما Interferon – γ

غالباً ما يشار إليه باسم "إنترفيرون المناعة"، وهو ينتج من قبل خلايا الإنسان التائية بعد تحفيزها بمستضد. يبدي الإنترفيرون– غاما تشابهاً تطورياً بسيطاً مع الإنترفيرون– ألفا و– بيتا. ويحتوي متعدد الببتيد الناضج لهذا الجزيء على 143 ثمالة حمض أميني التي يمكن أن تكون مرتبطة تفاضلياً بالغليكوزيل. صفاته المضادة للفيروسات أقل منها لدى الانترفيرون– ألفا، ولكنه يحفز تفعيل ونمو وتمايز تنوعاً واسعاً من الخلايا ذات العلاقة بالاستجابة المناعية والالتهاب. لقد جرى اعتماد شكلٍ مأشوبٍ من الإنترفيرون– غاما (مؤلفاً من 140 ثمالة حمض أميني) لعلاج داء الورم الحبيبي المزمن[18] (Chronic Granulomatous Disease (CGD))، وهو حالة وراثية نادرة تتميز بنقص في الأيض المؤكسد للخلايا البلعمية.

مكوِّن الاحمرار Erythropoietin

مُكَوِّن الاحمرار (إيبوتين– بيتا و–ألفا، Epoetin-α & β, EPO) هو بروتين سكري يتكون من 165 ثمالة حمض أميني. يُشكَّل في الكبد في مرحلة الجنين وفي الكِلى عند البالغين. ينتمي هرمون EPO إلى مجموعة عوامل نمو منشئات الدم (Haematopoietic growth factors) وهو يحفز تشكل الكريات الحمر من الخلايا السالفة (المصطلح على تسميتها BFU-E و CFU-E) في النخاع العظمي. ينتج مُكَوِّن الاحمرار المأشوب في أنظمة خلايا الثدييات (تستخدم خلايا مبيض الهامستر الصيني CHO في عملية الإنتاج التجارية – انظر أيضاً الفصل الثاني والعشرين) وذلك لضرورة الارتباط بالغليكوزيل: يحتوي جزيء EPO على سلسلة واحدة من

---

[18] داء الورم الحبيبي chronic granulomatus disease (CGD) وهي مجموعة متنوعة من الأمراض الوراثية التي تعاني فيها مجموعة من الخلايا المناعية صعوبة في تشكيل مركبات الأكسجين التفاعلية (وأهمها جذور فوق الأكسيد superoxide) المستخدمة في قتل عوامل إمراضية محددة. وهذا يقود إلى تشكيل أورام حبيبية في أعضاء متعددة من الجسم. يصيب هذا المرض 1 من كل 200,000 شخص في الولايات المتحدة، وتشخص 20 حالة جديدة على الأقل كل عام.

الكربوهيدرات المرتبطة بالأكسجين، وعلى ثلاث سلاسل من الكربوهيدرات المرتبطة بالآزوت التي هي ضرورية لفعالية الجزيء الحيوية. يستخدم مُكَوِّن الاحمرار علاجياً بشكل أساسي في حالات فقر الدم الكلوي، وأيضاً في استطبابات أخرى، مثل فقر الدم السرطاني؛ لقد كان هذا البروتين أول بروتين مأشوب علاجي وصلت قيمة مبيعاته إلى 1 بليون دولار أمريكي.

لقد اعتمد مؤخراً ميوتين EPA جديد (يدعى *داربيبويتين Darbepoetin*) يحتوي على خمس سلاسل قليلات السكر المرتبطة بالنيتروجين، والناتجة من استبدالات في أحماض أمينية واقعة على الهيكل الأساسي لببيتيد مُكَوِّن الاحمرار. ويزيد هذا التعديل في نصف عمر الجزيء في مصل الدم مما يسمح بوتيرة جرعات أقل.

العامل المحفز لتشكل مستعمرات الخلايا البيض المحببة

Granulocyte[19] colony stimulating factor

ينتمي العامل المحفز لتشكل مستعمرات الخلايا البيض المحببة (G-CSF) أيضاً إلى صنفٍ من عوامل النمو المكوِّنة للدم: وهي تحفز تكاثر وتمايز الخلايا العَدِلة السالفة (Neutrophil[20] precursor cells) لتعْطي خلايا الدم البيضاء الناضجة. لذلك فهو يُستخدم كعامل إضافي مرافق للعلاج الكيميائي للسرطان من أجل علاج قِلَّةُ العَدِلاَت (Neutropenia) الناجم عن تحطيم خلايا الدم البيضاء بتأثير العامل الكيميائي السام للخلايا. كما يستخدم في علاج كَبْت النخاع (Myelosuppression) الذي يحدث بعد عمليات زرع النخاع العظمي، وفي داء قِلَّة العَدِلاَت المزمن، وابيضاض الدم الحاد، وفَقْر الدَّمِ اللَّاتَنَسُّجِي (Aplastic anaemia)، وأيضاً من أجل نقل الخلايا السالفة المنشئة للدم من الدم المحيطي. إن هذا العامل هو بروتين سكري يضم 174 ثمالة حمض أميني. وقد طرحت في

---

[19] Granulocytes: خلايا دم بيضاء تحتوي على حبيبات في السيتوبلازما.

[20] Neutrophil : خلايا الدم البيضاء التي يمكن تلوينها فقط بواسطة صبغات متعادلة (محايدة).

السوق منتجات تحتوي إما على الجزيء المرتبط بالغليكوزيل المنتج من خلايا مبيض الهامستر الصيني CHO المأشوبة (لينوغراستيم *Lenograstim*[21]) أو البديل عنه، وهو الشكل غير المرتبط بالغليكوزيل، ولكنْ، ذو فعالية علاجية ذاتها، ينتج بواسطة البكتيريا القولونية الإشريكية المأشوبة (تسمى *فيلغراستيم Filagrastim*). يمتلك هذا الشكل ثمالة ميثيونين إضافية على النهاية الأمينية، وبغية إطالة نصف عمره وتخفيض عدد جرعاته جرى تطوير الشكل المرتبط بمتعدد غليكول الإيثلين (Polyethylene glycol) من هذا المركب (Pegylated form[22])، وهو يسمى بيغفيلغراستيم Pegfilgrastim، حيث ترتبط ثمالات متعددة الإيثيلين غليكول تشاركياً مع جزيء G-CSF.

مفعلات مولد البلازمين النسيجي Tissue plasminogen activators

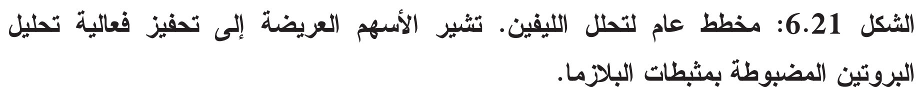
إن الذبحة القلبية الحادة (Acute myocardial infraction (AMI)) هي المسبب الرئيسي للموت في معظم دول الغرب. وأحد التوجهات المتبعة لتحسين علاج الذبحة القلبية الحادة هو استخدام الأنزيمات الحالّة للتخثرات. تقوم مفعِّلات مولّد البلازمين بتحفيز عملية تحليل بادئة أنزيم مولّد البلازمين غير الفعّال، الذي يجري في الدورة الدموية، ليحوله إلى أنزيم بروتياز البلازمين الفعّال. يستطيع البلازمين أن يفتت ليفين (Fibrin) تخثرات الدم غير المنحلة إلى شدف ببتيدية منحلة بحيث ينحل التخثر ويفتح الوعاء الدموي. ويمثل الشكل 21.6 ملخصاً لمخطط التفاعل المذكور.

---

[21] Lenograstim: وهو عامل محفز للخلايا البيض المحببة مأشوب ويعمل كمحفز للمناعة. وقد طور من قبل شركة ليغند فارماسوتيكلز تحت الاسم التجاري كراسلوبين Graslopin.

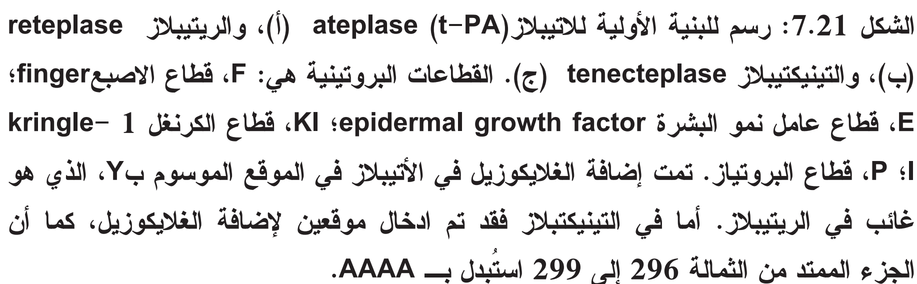
[22] PEGylation: وهي عملية الارتباط التكافؤي لسلاسل بوليمر الإيثيلين غليكول إلى جزيء آخر، عادة عقار أو بروتين علاجي. يمكن لهذه العملية أن تخفي العقار أو البوتين العلاجي عن النظام المناعي للشخص المعالَج، كما تزيد حجم العقار في المحلول مما يطيل عمره في الدم عن طريق تخفيض إزالته بواسطة الكلى.

مفعّلات بلازمينوجين
مثبطات مفعّلات بلازمينوجين
بلازمينوجين
بلازمين
مثبط بلازمين ألفا 2
فيبرينوجين
(مذاب)
فيبرين (ليفين)
(غير مذاب)
متخثر
ببتيد فيبرين
ببتيدات فيبرينوجين
(مذاب)



الشكل 6.21: مخطط عام لتحلل الليفين. تشير الأسهم العريضة إلى تحفيز فعالية تحليل البروتين المضبوطة بمثبطات البلازما.

(أ)
N103T // Q117N//
AAAA(296-299)
ألتيبلاز
تينيستابلاز
ΔE, F, K1, Glycosylation
(ب)
Protease
Kringle 2
ريتابلاز



الشكل 7.21: رسم للبنية الأولية للاتيبلاز(t–PA) ateplase (أ)، والريتيبلاز reteplase (ب)، والتينيكتيبلاز tenecteplase (ج). القطاعات البروتينية هي: F، قطاع الاصبعfinger؛ E، قطاع عامل نمو البشرة epidermal growth factor؛ KI، قطاع الكرنغل 1 –kringle I؛ P، قطاع البروتياز. تمت إضافة الغلايكوزيل في الأتيبلاز في الموقع الموسوم بY، الذي هو غائب في الريتيبلاز. أما في التينيكتبلاز فقد تم ادخال موقعين لإضافة الغلايكوزيل، كما أن الجزء الممتد من الثمالة 296 إلى 299 استُبدل بـــ AAAA.

يستخدم مفعّل مولّد البلازمين النسيجي (*الألتيبلاز (Ateplase)*، الشكل 7.21)، بالإضافة إلى بروتينات الميوتين التي تمتلك نصف عمر أكبر في المصل، كعوامل حالّة للخثرة Thrombolytic في علاج الذبحة القلبية الحادة، وهي تُختبر لعلاج أمراض أخرى ذات علاقة كالسكتة الدماغية، أو تجلط الدم في الأوردة العميقة Deep-Vein Thrombosis (DVT). وتضم البروتينات المذكورة آنفاً (الميوتينات): *الريتابلاز (Retaplase)*، وهو بروتين ميوتيني ناتج من إزالة قطاعات "الإصبع" و"شبيه عامل نمو البشرة" "EGF-like"، و"الكرينغل" "Kringle-1" من بروتين الــ t-PA (الأتيبلاز)، كما أنه غير مرتبط بالغليكوزيل، وذلك يعود إلى إنتاجه الذي تم بواسطة البكتيريا القولونية الأشريكية. أما *التينيكتبلاز (Tenectaplase)*، فقد تم فيها استبدال ثمالات ستة أحماض أمينية بأحماض أمينية أخرى بغية تحسين فعاليتها.

الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies

تمثل الأجسام المضادة وحيدة النسيلة القسم الأكبر من البروتينات العلاجية المستخدمة الآن في التطوير الدوائي. وقد تمت الموافقة على تسويق عدد منها (الجدول 4.21). بسبب استمناعها، تُستخدم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة الفأرية في العلاج في حالات استثنائية فقط، في حين تستخدم الأجسام المضادة الخيمرية (Chimeric) أو المؤنسنة (Humanised) (حيث تجمع تسلسلات القطاع المتبدل من جين الجسم المضاد لدى القوارض مع هيكل القطاع الثابت لجين الجسم المضاد لدى الإنسان) كبديلٍ عنها. في غضون ذلك، لقد أصبح ممكناً إيجاد أجسام مضادة بشرية (مثلاً هيوميرا Humira)، إما باستخدام تقانات عرض الجينات على سطح فيروس العاثية (Bacteriophage)، أو عن طريق توليدها في فئران محورة وراثياً تحمل ذخيرة جينات الغلوبولين المناعية عند الإنسان. لقد برهنت الأجسام المضادة وحيدة النسيلة عن نجاحها، وخاصة في علاج السرطان (مثل الهيرسبتين Herceptin والريتوكسيماب Rituximab)، والتهاب المفاصل الريثاني Rheumatoid arthritis (الريميكاد Remicade) وفي حالات الرفض المناعي للازدراع (مثلاً سيموليكت Simulect، وزيناباكس Zenapax).

بروتينات الاندماج Fusion proteins

إن القيام بدمج تسلسلات بروتينية ليس لها علاقة ببعضها بعضاً أصلاً بإمكانه أن يمنح جمعاً لصفات مميزة في جزيء منفرد. والأمثلة في هذا الخصوص هي السموم المناعية المأشوبة المستخدمة في العلاج التجريبي لسرطانات متنوعة. هذه السموم هي إما جزيئات متحدة كيميائياً أو بروتينات اندماج مأشوبة مبنية من جزء يرتبط بالخلية (في الغالب أجزاء من الجسم المضاد التي ترتبط بالمستضد)، وقطاع انتقال يتوسّط في عملية نقل البروتين كاملاً عبر الغشاء الخلوي، وجزء سام للخلية كقطاعاتٍ بروتينية مأخوذة من سموم بكتيرية (كسمّ الخانوق، أو السمّ الخارجي لبكتيريا بسيدوموناس)، أو عوامل كيميائية سامة. والفكرة هي أن العامل السام يجب أن يستهدف مجتمع الخلايا السرطانية المنتقاة من خلال قطاع الجسم المضاد الموجه ضد مستضدات محددة موجودة على سطح هذه الخلايا، التي يجب أن تُقتل بعد إدخالها الجزء السام من البروتين. لقد تم تطبيق هذا بنجاح في حالة *دينيليوكين دفتيتوكس* *Denileukin diftitox*[23] وهو تشكيل مكوّن من اندماج قطاعات السيتوكين (Cytokine)، والإنترلوكين – 2 ((Intelukine-2 (IL-2))، وسمّ الخناق. هذا المركب سوف يرتبط نوعياً بمستقبل الـــ IL-2 الذي يُعبّر عنه بشكل زائد على سطح خلايا الورم مسبباً موتها بعد ذلك. وقد اعتمد *دينيليوكين دفتيتوكس*في عام 1999 لعلاج لمفوما الخلايا التائية الجلدية.

إضافة إلى ذلك، هناك بروتين اندماج آخر تمت المصادقة عليه لتسويقه كعلاج وهو *إيتانرسيبت Etanercept* (الشكل 8.21) الذي يتكون من قطاع خارج خلوي للمستقبل P75 TNF والجزء القابل للتبلور (Fc)[24] من الجسم المضاد لدى الإنسان IgG1 (الغلوبين المناعي G1). يقوم *إيتانرسيبت* بإبطال عمل كل من وسيط بادئ الالتهاب، وعامل تنكرز الورم، كما يستخدم في علاج التهاب المفاصل الريثاني. ويفيد الجزء القابل للتبلور Fc في زيادة نصف العمر للبروتين في بلازما دم المريض.

---

[23] Ontak: الاسم التجاري.

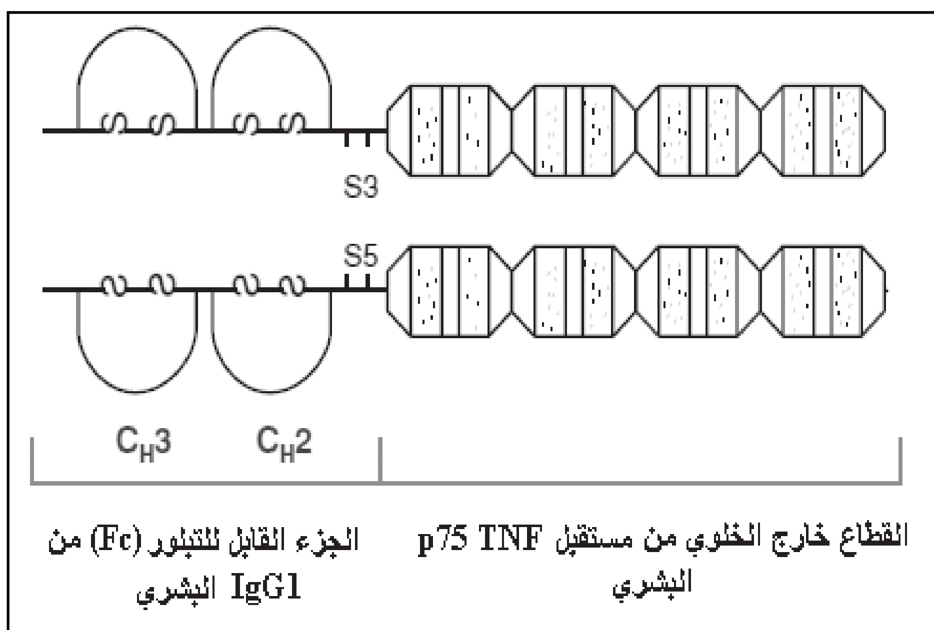
[24] Crystallizable fragment :Fc.

الجدول 4.21: الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المرخص لها كمنتجات دوائية

	اسم المنتج	الإسم العام	الحالات	المبتكر (المنشيء)/الشريك	تاريخ الترخيص
فأري (مأخوذ من الفأر)	أورثوكلون OKT3	ميوروموماب-CD31	رفض الازدراع	جونسون وجونسون (Johnson & Johnson)	1986
	بانوريكس	إيدريكولوماب	سرطان القولون	(Centocor/GSK)	1995
	أنتيلفا	أودوليموماب	رفض الازدراع	إميونوتيك/سانغستات (Immunotech/ SangStat)	1997
	زيفالين	إبريتوموماب تيكزيتان	لمفومة لاهودجكينية	(IDEC/Schering AG)	002
	بيكسار	توسيتوموماب و اليود-131	لمفومة لاهودجكينية	(Corixa/GSK)	2003
خيميري (Chimeric)	ريميكاد	إنفليكسيماب	التهاب المفاصل الريثاني	سينتوكور/شيرينغ بلاو (Centocor/Schering-Plough)	1996
	سيموليكت	بازيليكسيماب	رفض الازدراع	نوفارتيس (Novartis)	1996
	ماب ثيرا/ ريتوكسان	ريتوكسيماب	لمفومة لاهودجكينية	(IDEC/Genentech/Roche)	1997
	إيربيتوكس	سيتوكسيماب	سرطان القولون والمسقيم مستقيمي	(Imclone/Merck) KGaA	2003
شدفة رابطة للمستضد خيميرية	ريوبرو	أبسيكسيماكس	وقاية من أمراض القلب	سينتوكور/إلي ليلي (Centocor/Eli Lilly)	1995
مؤنسن	سيناغيز	بليفيزوماب	إصابة فيروسية تنفسية مخلوية[25]	مدليميون/آبوت (MedImmune/ Abbott)	1996
	زيناباكس	داكليزوماب	رفض الازدراع	(PDL/Roche)	1997

[25] Syncytial: مخلوي-ذو خلية عديدة النوى.

	هيرسيبتين	ترستوزوماب	سرطان الثدي	جنينتك/ روش (Genentech/Roche)	1998
	مايلوتارغ	جيمتوزوماب أوزوجاميسين	لوكيميا الدم النخاعي الحاد	سيلتيك/وايث (Celltech/Wyeth)	2000
	كامباث	أليمتوزوماب	لوكيميا الدم اللمفي المزمن	(ILEX/Schering AG)	2001
	كزولار	أوماليزوماب	الربو التحسسي	جنينتك/ نوفارتيس (Genentech/Novartis)	2002
	رابتيفا	إفاليزوماب	الصَّدَفية	كزوما/ جنينتك (Xoma/Genentech)	2003
	آفاستين	بيفاسيزوماب	سرطان القولون والمستقيم النقيل	جنينتك/ روش (Genentech/Roche)	2004
بشري	هيوميرا	أداليموماب	التهاب المفاصل الريثاني	كات/آبوت (CAT/Abbott)	2002



الشكل 8.21: بنية القطاعات في جزيء إيتانرسبت Etanercept.

بروتينات أخرى **Other proteins**

من بين البروتينات العلاجية المأشوبة المنتمية إلى الجيل الأول، هناك أنزيمات مثل أنزيم الغلوكوسيريبروسيداز Glucocerebrosidase، المستخدمة لعلاج نقص الغلوكوسيريبروسيداز (داء غتشرز[26] Gaucher)؛ وعوامل التجلط (العامل VIIa (السابع a)، والعامل VIII (الثامن)، والعامل IX (التاسع)) المستخدمة كعلاج بديل لداء الناعور Haemophilia[27])؛ والهرمونات مثل هرمون النمو لدى الإنسان أو الفوليتروبين (Follitropin). يضم الجدول 3.21 أمثلة أخرى من أدوية الجيل الأول والجيل الثاني الحيوية.

4.21 المظاهر التنظيمية الرقابية للبروتينات العلاجية

Regulatory aspects of therapeutic proteins

1.4.21 مخاطر التطوير والترخيص Development and approval risk

على عكس المركبات المصنعة كيميائياً لا يشكل موضوع السّمّية مشكلة عندما يتعلق الأمر بالبروتينات؛ كذلك فإن استخدامها يترافق مع عدد أقل من الآثار الجانبية غير المرغوبة، إلا إذا كانت هذه الآثار تتعلق بالهدف البيولوجي الذي يستهدفه البروتين. وكمواد طبيعية، فإن البروتينات هي غير مسرطنة أو مشوِّهة. وإذا ما أمكن تحديد طريقة التأثير، وتبين أنها صالحة كهدف للتدخل العلاجي، فإن الخطورة المرافقة لتطوير بروتينات بشرية مأشوبة لتكون عوامل دوائية هي أقل بشكل عام من تلك المرافقة لتطوير جزيئات منخفضة الوزن من الأدوية الجديدة. في الحقيقة، لقد تبين أن معدل الاستنزاف (أي نسبة المشاريع التي يتوجب إنهاؤها) في المراحل الأخيرة من التطوير الدوائي، حيث ينشأ الجزء الأكبر من تكاليف التطوير، أقل بكثير في حال الأدوية الحيوية منها في حال الأدوية المصنّعة من جزيئات صغيرة. زد على ذلك، أنه بعد استكمال التطوير الدوائي، فإن الأدوية

---

[26] Gaucher’s disease وهو مرض وراثي يتسبب في تجمع الدهون في خلايا التخزين نتيجة لنقص في فعالية أنزيم الغلوكوسيريبروسيداز في تحطيم السكر والدهون.

[27] الناعور: Haemophilia مرض وراثي يتميز بفشل الدم في التخثر.

البروتينية المبتكرة عادة ما يُرخّص لإطلاقها في السوق بشكل أسرع، وذلك يعود عالمياً إلى معايير الجودة المتفقق عليها.

في الولايات المتحدة، تنظَّم عملية الترخيص لأدوية البروتينات المأشوبة (فيما عدا اللقاحات) من قِبل مركز الأبحاث وتقييم الأدوية Center for Drug Evaluation and Researvh (CDER) التابع لإدارة الدواء الاتحادية Federal Drug Administration (FDA)؛ أما في أوروبا، فيتم ذلك من خلال إجراءات مركزية تقوم بها الوكالة الأوروبية لتقييم المنتجات الطبية European Agency for the Evaluation of Medical products (EMEA). تمتلك هذه الهيئات التنظيمية إرشادات محددة للترخيص للبروتينات العلاجية.

2.4.21 الأمانية Safety

على عكس البروتينات المعزولة من الإنسان أو الحيوان، بما فيها تلك المعزولة من مصادر محوَّرة، أو من كائنات ممرضة، كاللقاحات المأخوذة من البكتيريا أو الفيروسات (حتى لو كانت عالية النقاوة ومحللة بشكل دقيق)، فإن البروتينات المأشوبة لا يرافقها خطر التلوث بالمواد المثيرة للحساسية، أو الفيروسات الممرضة كفيروس نقص المناعة المكتسب، والبريونات التي تنتقل من الماشية أو من الإنسان متسببة بنوعٍ جديد من مرض جاكوب الكروتسفيلدت Creutzfeldt Jakob. لهذا السبب، يتم حالياً تصنيع أي من عوامل التجلط (التي كانت تنتج سابقاً من دم الإنسان أو من البلازما)، أوهرمونات النمو البشرية (التي كان يتم الحصول عليها سابقاً من مستخلصات الغدة النخامية (Adenohypophysis))، أو لقاحات التهاب الكبد من نوع B في أنظمة مأشوبة.

من غير المتوقع أن تكون البروتينات البشرية المأشوبة مستمْنِعة (أي أن تثير رد فعل مناعي). ولكن، ووفقاً لنظام التعبير الجيني المستخدم يمكن للبروتينات المنتجة أن تختلف عن البروتينات البشرية الأصلية في التعديل الذي يطرأ عليها في مرحلة ما بعد الترجمة (أي الارتباط بالغليكوزيل، أو معالجة النهاية الآزوتية، ... إلخ)، كما في

التعديلات على تسلسل الأحماض الأمينية (في بروتينات الميوتين) التي قد تقود إلى تشكل حواتم (محددات استمناعية) جديدة. لكنه من الممكن أيضاً للبروتينات البشرية المأشوبة أن تكون مستمنعة، وهذا يعتمد على العملية التصنيعية، خاصة إذا لم تكن شروط انسياب عملية الإنتاج وتركيب المستحضر الدوائي تمنع وجود تكتلات البروتين. إضافةً إلى ذلك، وبناء على نمط تأثير البروتين في العلاج، فإن حصول التكتلات قد يقود إلى فقدان الدواء لفعاليته، أو تحفيز تفاعلات الحساسية، أو (في أسوأ الحالات) إلى انهيار التحمل الذاتي وإبطال عمل بروتينات الجسم الطبيعية. في الوقت الحالي، لا تتوفر وسائل تحليل في الزجاج أو نماذج حيوانية من أجل التنبؤ باستمناعية هذه الأدوية البروتينية في المرضى، مما يتطلب العمل على تقييمها بحرص خلال مراحل التطوير الدوائي، وكذلك بعد إطلاقها في السوق.

5.21 إطلالة على مستقبل العلاج بالبروتينات

Outlook to the future of protein therapy

لا تتمتع المداواة بالبروتينات في جميع المجالات العلاجية والاستطبابات بنفس الجاذبية، لدى مقارنتها بمقاربات أخرى منافسة لها مثل المواد الكيماوية منخفضة الوزن الجزيئي. إن الأدوية البروتينية مفيدة بشكل خاص في الحالات التالية:

- في الاستطبابات التي لا يتوفر لها علاج بديل، وبشكل خاص في حالة الأمراض التي تشكل خطراً على الحياة مثل السرطان، والالتهابات أو الإصابات الفيروسية.
- في حالات *العلاج البديل* بحيث تكون بروتينات لازمة للإنسان مفقودة أو غير فعالة، مثلاً عوز (نقص) الأدينوزين دي أميناز[28] (Adenosine deaminase deficiency (DAD) أو عوز عوامل التخثر.

[28] DAD: هو خلل أيضي (استقلابي) ناجم عن طفرة في الجين الذي يشفر للأنزيم أدينوزين دي أميناز موجود على كروموسوم الجسدي 20. مما ينجم عنه عدم إنتاج هذا الأنزيم وهذا يقود إلى تراكم مادة سامة تدعى دي أوكسي أدينوزين مما يودي إلى تخريب الخلايا المناعية التائية والبائية، وهذا يقود إلى نقص مناعة حاد.

- من أجل التحكم *بتنظيم عمليات حيوية* مثل الأيض، والنمو الخلوي، والتئام الجروح، إلخ...، أو للتأثير في *الجهاز المناعي* من خلال قيام البروتينات بدور الهرمونات، أوعوامل النمو أو السيتوكينات (كالإنسولين، أو الإريثروبويتين، أو الـــ G-CSF، أو الموَجِّه الجسدي (سوماتوتروبن Somatotropin)، أو الإنترفيرون أو الإنتلوكين). ففي هذه الحالات يجب التحكم بالتفاعل البروتيني–البروتيني. وهذا قد يكون أكثر فاعلية عند استخدام بروتينات علاجية بمثابة "روابط طبيعية" تمت أمثلتها خلال عملية التطور، مقارنة بالمواد الكيمياوية الصغيرة، كلقاحات، وخاصة ضد الأمراض الفيروسية المعدية.
- كلقاحات، خاصةً ضد أمراض الإصابات الفيروسية.

لقد أصبحت البروتينات البشرية المطابقة للمواد الموجودة في الجسم متوفرة مع قدوم تكنولوجيا الجينات. بالإضافة إلى الجيل الأول من المواد العلاجية الحيوية، يجري إدخال عدد متزايد من ميوتينات الجيل الثاني (المعاد تصميمها بخصائص محسنة) إلى السوق وخاصة الأجسام المضادة المؤنسنة أو تلك البشرية الصرفة. وبمجرد حل مشاكل ضعف فعالية التحويل والتعبير، فقد يصبح ممكناً في المستقبل استبدال الجينات المختلة، أو إضافة جينات علاجية، إلى الخلايا في جسم الإنسان بحيث يقوم جسم المريض نفسه بدور الوسيلة المصنعة التي يجري فيها تصنيع البروتينات العلاجية. وبهذا المعنى، فإن *العلاج الجينيي* قد يمثل الجيل الثالث المستقبلي للبروتينات العلاجية، وقد يساعد في مقاربة الهدف النهائي المتمثل في شفاء، بدلاً من معالجة، المرض.

6.21 قراءات إضافية Further reading

Bergmeyer, H. U., M. Grassl and J. Bergmeyer, (eds.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: VCH, 1983-1986. Vols. 1-12.

Crommelin, D. J. A. and R. D. Sindelar, *Pharmaceutical Biotechnology*. 2nd ed. London: Taylor and Francis, 2002.

Dembowski, K. and P. Stadler, *Novel Therapeutic Proteins*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

Ibelgaufts, H. *Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia* (2003), <http://www.copewithcytokines.de>.

Kopetzki, E., K. Lehnert, and P. Buckel, "Enzymes in Diagnostics: Achievements and Possibilities of Recombinant DNA Technology," *Clinical Chemistry*, vol. 40 (1994), pp. 688-704.

Kresse, G.-B. "Analytical Uses of Enzymes," in: H.-J. Rehm and G. Reed, eds., *Biotechnology*, 2^{nd} ed. Weinheim: Verlag Chemie (1995), vol. 9, pp. 138-163.

Lauwers, A. and S. Scharpé, *Pharmaceutical Enzymes*. New York: Marcel Dekker, 1997.

Rudolph, R. and H. Lilie, "In Vitro Folding of Inclusion Body Proteins," *Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 10 (1996), pp. 49-56.

Walsh, G. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. 2^{nd} ed. Chichester: John Wiley and Sons, 2003.

Walsh, G. and D. R. Headon, *Protein Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons, 1994.

الفصل الثاني والعشرون

مزرعة الحشرات والثدييات الخلوية

Insect and Mammalian Cell Culture

C .J. Hewitt	سي.جي. هيويت
The University of Birmingham, UK	جامعة بيرمنغهام، المملكة المتحدة
B. Isailovic	بي. ايسيلوفيتش
The University of Birmingham, UK	جامعة بيرمنغهام، المملكة المتحدة
N. T. Mukwena	أن. تي مكوينا
The University of Birmingham, UK	جامعة المملكة بيرمنغهام، المملكة المتحدة
A. W. Nienow	أ.و. نيناو
The University of Birmingham, UK	جامعة المملكة بيرمنغهام، المملكة المتحدة

1.22 المقدمة Introduction

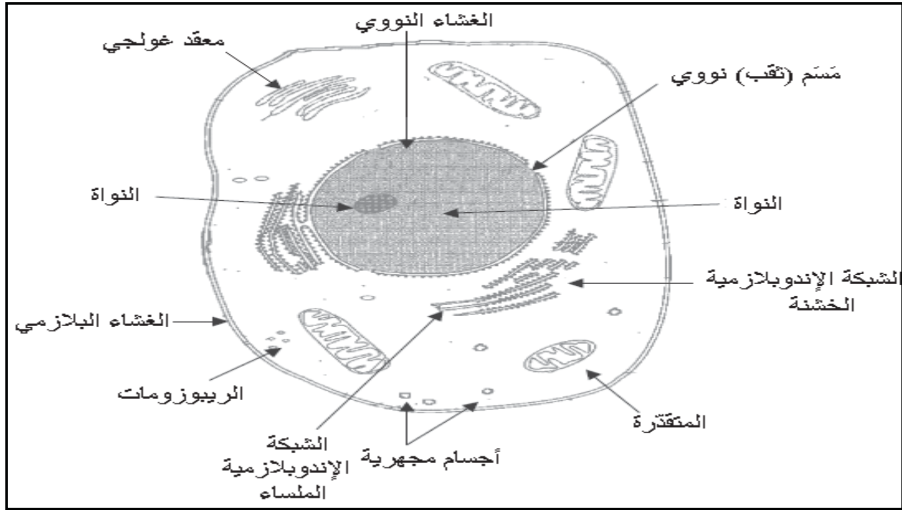
لقد اختيرت البكتيريا والخميرة في الإنتاج الصناعي للبروتينات المأشوبة المتغايرة لسنين عديدة. ولقد أصبحت المقدرة على زرع السلالات البكتيرية بكثافة عالية وعلى نطاق واسع تقنية ذات أهمية متزايدة على امتداد مجال التقانة الحيوية، ابتداءً من برامج البحث الأساسية (دراسات بُنيوية أو حركية) وحتى عمليات إنتاج الأدوية على مستوى صناعي. وتبقى البكتيريا القولونية الإشريكية (*Escherichia coli*) واحدة من أكثر الكائنات جاذبية لإنتاج البروتينات المأشوبة (انظر الفصل

الرابع والخامس والواحد والعشرين) لأن تركيبها الوراثي ووظائفها مفهومة بشكل جيد، كما أن الفعالية الحيوية للبروتينات المأشوبة التي تنتجها لا تتطلب أية تعديلات معقدة بعد عملية الترجمة (مثل إضافة مجموعة الغلايكوزيل أو إنشاء رابط ثنائي الكبريت). إلا أن هناك عوائق هامة ترتبط باستخدام الكائنات ذات نواة أولية. فالنسبة المنخفضة لنيوكليوتيدات غوانين وسايتوزين GC في جينوم هذه الكائنات، مقارنة بجينات الثدييات، ووجود شيفرات نادرة غالباً ما تتسبب في مستوى تعبير منخفض أو في أشكال مبتورة غير فعالة من البروتين. إذ في العديد من الحالات، يتم التعبير عن البروتينات على شكل أجسام ضمنية غير منحلة في المحيط البلازمي للبكتيريا. كما أن البكتيريا غير قادرة على القيام بتعديلات ما بعد الترجمة التي تؤثر بقوة في ثبات البروتين، والتفافه، وانحلاليته، وبالتالي في فعاليته الحيوية. أما الخميرة (مثل خميرة *Saccaromyces cerevisiae*، أو خميرة *Pichia pastoris*)، وبالرغم من أنه يمكنها القيام بتعديلات ما بعد الترجمة مشابهة لتلك التي تقوم بها خلايا حقيقية النوى الأكثر تعقيداً (انظر الفصل الخامس)، فإنه يبدو أن عملية ارتباط الغلايكوزيل بالنيتروجين (N-glycosylation) لتعديل بروتينات الثدييات لا تجري بشكل فعّال في خلايا الخميرة. إضافة إلى ذلك، فإن كلّاً من خلايا الخميرة والبكتيريا محاطة بجدار خلوي قوي ميكانيكياً يعيق استرجاع أي بروتين لم يتم إفرازه خارج هذه الخلايا. لذلك، بما أن خلايا الحشرات والثدييات لا تمتلك جداراً خلوياً، فقد تم تطويرها لإنتاج نطاق واسع من البروتينات المأشوبة المتغايرة، التي سيكون استرجاعها وتنقيتها صعباً لو تم إنتاجها في غير هذه الخلايا.

2.22 خلايا الثدييات Mammalian cells

إن أول إثبات لإمكانية زرع خلايا الثدييات في الزجاج (خارج الجسم) من أجل التقانة الحيوية كان عام 1949 عندما بيّن أنديرز (J. F. Enders) أنه بالإمكان إنتاج الفيروس (Polio virus) المسبب لشلل الأطفال من خلايا الرئيسيات العصبية ونسيج الكلية. وفي الخمسينيات من القرن الماضي أُنتجت مخبرياً لقاحات ضد فيروس الشلل من مزارع خلايا الكِلية والخصية لدى القرد. أتبع ذلك مباشرة إنتاج لقاحات فيروسية أخرى- ولقاح أبو كعب (عام 1951)، لقاح الحصبة (عام 1958)،

ولقاح فيروس الحمَّر الغديّة (عام 1958)، هذه اللقاحات أُنتجت جميعها بواسطة مزارع خلوية لأنواع حيوانات شتى. لم تنشأ مزارع الثدييات الخلوية بشكل حقيقي حتى السبعينيات من القرن الماضي مع تطوير خطوط الخلايا الورمية الهجينة (Hybridoma) ونشوء تقانات الــ DNA المأشوب. *والخط الخلوي* هو مجتمع من الخلايا المتماثلة جينياً (كلونات Clones) المتحدِّرة من خلية أصل واحدة. وبالرغم من أن إنتاج المادة الحيوية للقاحات ما زال مهماً اليوم، فإن مزارع الثدييات الخلوية تُستخدم أيضاً في الاختبارات الدوائية، وفي أبحاث السُمِّية، وتصنيع أنسجة الجلد، والغضاريف في الزجاج لأغراض جراحية.



الشكل 1.22: رسم توضيحي لخلية حقيقية النواة.

لا تتواجد خلايا الثدييات في الجسم (انظر الشكل 1.22) بشكل منعزل، كما في خلايا الجراثيم، ولكنها تنتظم داخل الحيوان ككل في هيئة أعضاء وظيفية (مثلاً الكلية، والكبد.. الخ) منوطة بهدف محدد، مثلاً لضمان النجاح في عملية التكاثر للحيوان ككل. عندما تعزل خلايا محددة من حيوان ما وتوضع تحت شروط زرع مناسبة (انظر الشكل 6.22)، فإن بعض خطوط هذه الخلايا سينقسم، وقسماً آخر سيحافظ على حيويته بدون انقسام، والقليل سيموت في الحال. إن أكثر الخلايا ملاءمة للنمو في مزارع خلوية نقية هي الخلايا التي تستمر في النمو والانقسام داخل الكائن الأصل مثل الخلايا الظهارية Epithelial (الجلد)، والخلايا الورمية

النخاعية Myeloma (السرطانية)، خلايا الأرومات الليفية Fibroblast (النسيج الضام). لقد أحدث عزل *الأجسام المضادة وحيدة النسيلة* من الفأر (mAbs) من قبل كوهلر (Köhler) وميليستاين (Milstein) في العام 1975 ثورة في استخدام خلايا الثدييات في التقانة الحيوية، كاشفة عن إمكانيات خلايا الثدييات الكامنة في المجال الطبي والتجاري (انظر الفصل الخامس والعشرين). لقد أحرز كوهلر وميليستاين هذا عن طريق دمج لمفاويات بائية (B-lymphocytes) مُمَنَّعة بشكلٍ نوعي وهي خلايا دم بيضاء تفرز أجسام مضادة من الفئران مع خلايا ورمية نخاعية (خلايا النخاع العظمي السرطانية) لابتكار أول خلية ورمية هجينة Hybridoma. وبفعلهم هذا، تم الجمع بين مقدرة اللمفاويات البائية على إنتاج جسم مضاد نوعي (متخصص) ومقدرة النمو غير المحدودة للخلايا الورمية النخاعية في كينونة واحدة. ما يعني أن خلايا كهذه لديها المقدرة على النمو والانقسام بشكل مستمر شريطة توفر شروط النمو الصحيحة. ومن الميزات الأخرى لهذه الخلايا هو قلة اعتمادها على عوامل النمو، وزيادة في معدلات نموها، وسهولة زراعتها حتى بوجود تقلبات في البيئة المجهرية التي تنمو فيها هذه الخلايا، وخاصة عند استخدام بيئات مزارع معلقة. ولكن، امتلاك مثل هذه الخلايا لمعدلات أيض مرتفعة فإنه يؤدي إلى ازدياد مصاحب في تشكل المنتجات الثانوية المثبطة. لقد سمحت هذه التطورات بإنتاج (وفي بعض الحالات، إفراز) بروتينات تحمل التعديلات الصحيحة في مرحلة ما بعد الترجمة، وبشكل خاص إضافة الغليكوزيل، وبالتالي الحصول على بروتينات فعالة حيوياً بالشكل المطلوب. إلا أن قيمة تلك الأجسام المضادة وحيدة النسيلة كمركبات علاجية للإنسان كانت محدودة في البداية، وذلك بسبب فقد فعاليتها سريعاً بفعل الجهاز المناعي عند الإنسان، وبسبب رد الفعل التحسسي لهذه الأجسام من قبل المرضى. في العام 1986، قدم وينتر (G. Winter) وزملاؤه تقنيات "لأنسنة" الأجسام المضادة الفأرية بحيث أصبحت تشابه الأجسام المضادة لدى الانسان مما زاد من ملاءمة وفعالية استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المنتجة "اصطناعياً" كدواء للانسان (انظر الجدول 1.22).

الجدول 1.22: أجسام مضادة وحيدة النسيلة أُنتجت بواسطة خلايا حيوانية وتم اعتمادها لأهداف متنوعة

	المنتج	التطبيق
علاجية	ريتوكسان (Retuxan)	ليمفومة لاهودجكينية
	سينتوكسين (Centoxn)	تعفن الدم
	بانوريكس (Panorexin)	سرطان القولون والمستقيم
تشخيصي في الجسم الحي	بروستا سينت (Prosta Scint)	سرطان البروستات
	مايسينت (Myscint)	تنكرز (نخر) عضلة القلب
تحضيري	روفيرون (Roferon)	تنقية IFNα2A من الحلالة الخلوية
	مونوناين (ono Nine)	تنقية عامل تخثر الدم الثامن من مصل الدم
	كوجينات (Kogenate)	تنقية عامل تخثر الدم الثامن من مزرعة الخلايا الحيوانية

1.2.22 التعديل الوراثي للخطوط الخلوية الثديية

Genetic modification of mammalian cell lines

إن أول التجارب حول الـــ DNA المأشوب Recombinant DNA (rDNA)أو التناول الجيني تم نشرها في العام 1973 من قبل ولتر جيلبرت (Walter Gilbert) وزملائه الذين طوروا بروتوكولات لتكوين قطع فعالة صنعية من الـــ DNA أو الجينات، وذلك عن طريق قص شدف من الـــ DNA أولاً، ثم

دمجها مع شدف أخرى من نوع من الكائنات مختلف (وهذا يدعى بعملية الجَدْل). بعد ذلك تُدخل هذه القطع المأشوبة من الـــ DNA داخل خلية مضيفة عن طريق ناقل يحتويها، غالباً ما يكون بلازميد بكتيري، وذلك من أجل جدلها داخل جينوم (DNA) الخلية (الثديية) المضيفة (انظر الفصل الرابع). ولكن قبل الجدل فإنه يتم أولاً تضخيم النواقل بإدخالها إلى بكتيريا سريعة النمو، وهي عادة ما تكون بكتيريا *القولونية الإشريكية*. لقد استخدمت مثل هذه التقانة في إنتاج مفعّل البلازمينوجين النسيجي Tissue plasminogen activator (tPA)، الذي يستخدم في منع تجلطات الدم لدى مرضى الأزمات القلبية. تم تسويقه لأول مرة من قبل شركة جينينيتك (Genentech) في الولايات المتحدة الأمريكية، ورُخِّص له في العام 1987. كما جرت كلونته والتعبير عنه بواسطة خلايا مبيض هامستر صيني (Chinese hamster ovary (CHO)) معدلة وراثياً.

ليست خلايا الورم الهجينة هي المصدر الثديي الوحيد لمنتجات التقانة الحيوية المتوفرة تجارياً. لقد أدى استثمار تقانة الـــ DNA المأشوب إلى تطوير عدد لا حصر له من خلايا الثديات المكلونة (خطوط خلوية) المأخوذة من أعضاء (مثلاً الرئتين، المبايض، الكبد والكلى) العديد من الثدييات بما فيها الانسان، والهامستر، والجرذان والأغنام والأحصنة (انظر الجدول 2.22). لقد أُحرز هذا التطوير بواسطة التطفير التفاضلي أو التعداء (Transfection) بجينات سرطانية (الأنكوجينات Oncogenes)، في حين اشتُقت خطوط خلوية أخرى من أنسجة سرطانية تسببت فيها الإصابة الفيروسية. واستُغلت أيضاً تقنيات التلاعب الجيني لإنتاج أجسام مضادة مأشوبة باستخدام خلايا ورمية نخاعية كخلايا مضيفة. إن الخيار المفضل حالياً لإنتاج البروتينات المأشوبة هو خلايا مبيض الهامستر الصيني وذلك بسبب سهولة نموها في مزارع معلقة، في حين تستخدم خلايا كلى صغار الهامستر Baby Hamster kidney (BHK) في إنتاج اللقاحات، وذلك لأن إصابتها بالفيروس لا تؤثر في نموها (انظر الجدول 3.22). وهكذا مهدت هذه الإنجازات المهمة الطريق إلى تصنيع البروتينات على نطاق واسع في إطار صناعة تقانة حيوية يبلغ قيمتها العديد من بلايين الدولارات.

الجدول 2.22:	الخطوط الخلوية الأكثر استخداماً في التقانة الحيوية
الخط الخلوي	**المصدر الثديي للخط الخلوي**
CHO	مبيض الهامستر الصيني
MDCK	كِلى كلب كوكر سبانيال
Hela	سرطان عنق الرحم عند الإنسان
NS0	ورم نخاعي
BHK21	أرومة ليفية من كلى الهامستر السوري
HEK293	كِلى مُضغية بشرية
Vero	خلايا كِلى القرد
GH3	ورم الغدة النخامية الجرذية
WI-38	خلايا رئة جنين الإنسان
J558L	ورم نخاعي فأري
HepZ	خلايا كبد جرذية

الجدول 3.22:	عوامل دوائية علاجية أُنتجت بواسطة خلايا ثديية وتم اعتمادها لأهداف طبية	
المنتج	**البروتين**	**الخط الخلوي**
إيبوجين، إيبركس (Epogen, Eprex)	إريثروبويتين (مكون الاحمرار) (عامل مضاد لفقر الدم)	CHO
زايزين (Saizen)	هرمون النمو لدى النسان	CHO
ريكومبينات (Recombinant)	العامل السابع (عامل مضاد تخثر الدم)	CHO
غونال (Gonal)	الهرمون المحفز للجريب (علاج العقم)	CHO
أفونيكس (Avonex)	إنترفيرون β (عقار مضاد للسرطان)	CHO
نوفو سفن (Novo Seven)	العامل الثامن (عامل مضاد تخثر الدم)	BHK

2.2.22 منتجات تجارية من خطوط خلوية ثديية

Commercial products from mammalian cell lines

إن معظم البروتينات التي تفرز من قبل خلايا الثدييات، أو تلك التي تنقل إلى عُضيَّات أخرى داخل الخلية، هي بروتينات سكرية (غليكوبروتينات). والبروتينات السكرية هي بروتينات أضيف إليها مجموعة سكر بعد مرحلة الترجمة من خلال عملية تدعى الارتباط بالغلايكوزيل Glycosylation التي تتم في الشبكة الإندوبلازمية Endoplasmic reticulum (ER) وجهاز غولجي في الخلايا حقيقية النوى (انظر الشكل 1.22). نادراً ما تحصل عملية الارتباط بالغلايكوزيل على البروتينات المذابة في العصارة الخلوية Cytosol. وبما أن للبروتينات السكرية مواقع فعل محددة داخل الكائن الحي بشكلٍ عام، وبذلك فهي تمتلك القوة لتكون عوامل علاجية ذات قيمة عالية، فقد أصبحت هي المنتجات الأكثر شيوعاً للمزارع الخلوية الثديية. لا تتبع عملية الارتباط بالغلايكوزيل أي مخطط كتلك التي يتّبعها تصنيع البروتين (ليس هناك عارضة DNA أو RNA). لذلك، يوجد هناك مدى واسع من بنى (تراكيب) قليلات السكر (Oligosaccharides) أو البروتينات السكرية التي يمكن أن تُضاف، مما يؤدي إلى تشكيلة بروتينات سكرية (أشكال سكرية) لديها نفس تسلسل الأحماض الأمينية، ولكنها تمتلك تراكيب مختلفة من قليلات السكر. هناك نوعان من ارتباط الغليكوزيل: ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت (N-linked glycosylation) وآخر بالأكسجين (O-linked (glycosylation)، ولكن الأول هو الأكثر شيوعاً. في حالة ارتباط الغليوكوزيل بالأزوت، يرتبط نوع من قليلات السكر مكون من-N أسيتيل غلوكوزامين (N-acetyl glucosamine)، والمانوز والغلوكوز، مع مجموعة الأمين (NH_2) الموجودة على السلسلة الجانبية لثمالة الحمض الأميني أسبرجين في البروتين وذلك في الشبكة الإندوبلازمية في الخلية. تؤدي التعديلات اللاحقة لهذا الجزيء قليل السكريات المرتبط بالأسبرجين في جهاز غولجي إلى تشكيلة كاملة من البروتينات السكرية الناضجة. أما في الحالة الأقل شيوعاً عند ارتباط الغليكوزيل بالأكسجين، فإن قليلات السكر هنا ترتبط بمجموعة

الهيدروكسيل (OH) الموجودة على السلسلة الجانبية لثمالة كل من الأحماض الأمينية السيرين، والثريونين، وهيدروكسيل اللايزين. غالباً ما يكون وجود قليل السكريات وتركيبه الصحيح ضرورياً من أجل الحصول على فعالية حيوية كاملة للبروتين السكري وتوجيهه إلى موقع الفعل الخاص به. وإذا ما كان الارتباط بالغليكوزيل شرطاً لفعالية البروتين السكري الحيوية، فإن إنتاجه يكون عادة في مزارع الخلايا الثديية لأن البكتيريا لا تمتلك الأنزيمات ولا العُضَيَّات الصحيحة للقيام بذلك. ومن الممكن أيضاً استخدام خلايا الخميرة، أو خلايا الفطور أو خلايا الحشرات من أجل إنتاج بروتينات سكرية لقدرتها على تنفيذ بعض أشكال الارتباط بالغليكوزيل (انظر الفصل الخامس والفقرة 3.22)، لكن مدى وشكل هذه العملية مختلف عن تلك الموجودة في خلايا الثدييات، وبذلك يكون اختيار نظام التعبير الجيني أمراً مهماً. أما البروتينات التي لا تحتاج إلى الارتباط بالغليكوزيل من أجل تحقيق فعاليتها الحيوية الكاملة (مثلاً، الإنسولين، والألبيومين في مصل دم الإنسان، وهرمون النمو لدى الانسان والهيموغلوبين) فيمكن إنتاجها بكلفة أقل بكثير بواسطة أنظمة تعبير بكتيرية.

تبقى الأجسام المضادة وحيدة النسيلة (mAbs) أكثرمنتجات البروتينات السكرية شهرة التي تنتج بواسطة مزارع خلايا ثدييات، وهي تشكل ربع المنتجات العلاجية التي يتم تطويرها ضمن صناعة التقانة الحيوية، قُدّرت قيمتها بــ 2.7 بليون دولار أمريكي في العام 2001 (انظر الجدول 1.22). إن معظم هذه المنتجات مستعملة في علاج السرطان والأمراض المُعدية. إذ يمكن استخدام أجسام مضادة متخصصة بخلية ورمية أو مصابة وذلك بقرنها بمركب سام للخلية (مثلاً الريسين) فتقوم باستهداف الخلايا السرطانية أو المصابة مسببة موتها من غير إحداث أي ضرر للأنسجة السليمة المحيطة. كما يمكن استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة لمنع رفض الجسم للأعضاء المزدرعة (زراعة الأعضاء). إن المقدرة الفائقة جداً على تشكيل الروابط النوعية التي تتمتع بها الأجسام المضادة وحيدة النسيلة تعني أنها أيضاً أدوات قيِّمة في مجال التشخيص الطبي (مثلاً اختبارات الحمل) ومسابر لتقنيات البيولوجيا الجزيئية التحليلية، مثال *التشرب اللطخي بطريقة ويسترن (Western*

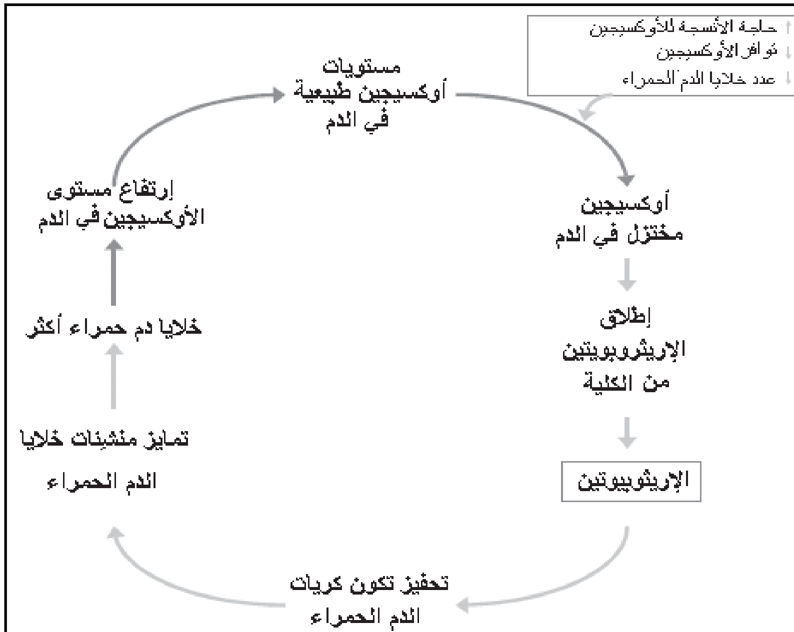
blot). التشرب اللطخي بطريقة ويسترن هي تقنية لقياس التعبير البروتيني في خلية أو مستخلص نسيجي باستخدام التفاعل المتبادل القائم بين الجسم المضاد والجسم المستضد (تفاعل الجسم المضاد/الجسم المستضد). يمكن أيضاً استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة كمكونات في جهاز فصل كروماتوغرافي لتنقية البروتينات أثناء معالجتها. في هذه العملية يتم تثبيت أجسام مضادة متخصصة بالمنتج المرغوب تنقيته على سطح جامد داخل عمود التنقية. يمرر الطافي الحاوي على البروتين المطلوب عبر العمود حيث يرتبط البروتين مع الجسم المضاد المثبت ويتم التخلص من الطافي الحاوي على الشوائب الناتجة أثناء عملية الاستخلاص. بعد ذلك يمكن استرجاع البروتين النقي من العمود بطرائق متعددة.

تصنع الأجسام المضادة المؤنسنة (أي الأجسام المضادة المطوَّرة إلى بروتينات بشرية) اليوم من قبل خطوط خلوية مأخوذة من الثدييات بدلاً من الحصول عليها من فئران ممنَّعة (مُلقَّحة) كما شرح كوهلر وميليستاين لأول مرة. إذ ينتج من ذلك أجسام مضادة تحتوي على أحماض أمينية بشرية أكثر من قبل (حيث تأتي الحواتِم فقط من الفئران)، وبذلك يكون قد تم التخلص من كافة الاستجابات المناعية لهذه الأجسام المضادة ويمكن إعطاؤها للمرضى بجرعات متعددة بدون الخوف من ردة فعل مناعي. من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة العلاجية الموجودة في الأسواق الآن أبسيكسيماب (Abciximab) من شركة (ريوبرو ReoPro)، وهو جسم مضاد من الفأر والإنسان يمنع تكتل صفيحات الدم. وهو مرخص كمضاف (مساعد) للأسبرين والهيبارين لدى مرضى رَأب الوعاء التاجي (Coronary angioplasty) العالي الخطورة من أجل منع الانسداد التاجي المتكرر.

لا يوجد حالياً (2005) أي جسم مضاد وحيد النسيلة علاجي مرخصاً له من أجل علاج السرطان، إلا أن عدداً كبيراً منها الآن هو في مرحلة التطوير المتأخرة والاختبارات السريرية.

يشكل الإريثروبويتين Erythropoietin (EPO)، العامل المضاد لفقر الدم، بمبيعاته التي تبلغ 17 بليون دولار أمريكي المستحضر الدوائي الحيوي الأكثر مبيعاً (انظر الشكل 2.22). والإريثروبويتين هو بروتين مأشوب يسوَّق

تحت أسماء متعددة كما يُشتق من مصادر متعددة. سوّق الإريثروبويتين (EPO) من قبل شركة آمجين (Amgen) المحدودة (باسم إيبوجين) عام 1989 وهو منتج بواسطة خلايا مبيض الهامستر الصيني المهندسة وراثياً لإنتاجه من خلال إدخال الـــ DNA لذي يُشفر إلى الإريثروبويتين البولي لدى الانسان.



الشكل 2.22: مخطط توضيحي يبين كيفية تأثير العامل المضاد لفقر الدم، والإريثروبويتين (EPO)، والمنتج الدوائي الحيوي الأكثر مبيعاً، في جسم الإنسان.

3.22 خلايا الحشرات Insect cells

تاريخياً، لقد كانت الحاجة إلى توسيع المعرفة بالأمراض المُعدية التي تسببها الفيروسات لدى الحيوانات والنباتات وتنقلها الحشرات الحافز الأساسي لدراسة شكل ووظيفة الحشرات. بعض الأمثلة المعروفة لهذه الأمراض هي: التهاب الدماغ الياباني والتهاب الدماغ المعروف بسانت لويس St.Louis اللذين يتسبب بهما الفيروسات المنقولة بالمفصليات arboviruses والتي يحملها البعوض، والداء الفيلاري (داء قدم الفيل) الواسع الانتشار الذي يسببه ذباب من نوع *الذلفاء*

Simulium. في السبعينيات من القرن الماضي، أوليت المشاكل الزراعية مثل، التكاثر غير المضبوط للآفات الحشرية، انتباهاً خاصاً. وتجلى الحل في الفيروسات العصوية (Baculoviruses)، وهي مجموعة من الفيروسات التي تبيَّن أنها ممرضة للحشرات فقط، وليس للمحاصيل المرتبطة بهذه الحشرات أو الفقاريات. بعد ذلك بفترة وجيزة، جرى الترخيص لمنتجات الفيروسات العصوية من قِبل الجهات الرقابية لتستخدم في مكافحة الحشرات المؤذية. وفي عام 1983، تم الاعتراف بخلايا الحشرات (انظر الشكل 1.22) مقترنة *بأنظمة نواقل تعبير من الفيروس العصوي* (BEVS) *Baculovirus Expression Vector Systems* كآليات تعبير بديلة وفعّالة للبروتين من أجل إنتاجه على نطاق واسع. ومنذ ذلك الوقت، تم توثيق أمثلة عديدة من التعبير عن بروتينات ثدييات فعالة، كالمستقبلات، وبروتينات القنوات، ومستضدات فيروسية، وأنزيمات، وأجسام مضادة، وبيبتيدات فعالة حيوياً باستخدام مكتبات DNA متمِّم (cDNA). إضافة إلى ذلك، تشكل أنظمة نواقل التعبير من الفيروس العصوي (BEVS) الأساس للعديد من المجازفات في مجال التقانة الحيوية التي تهدف إلى إنتاج مستحضرات دوائية، ولقاحات، وكواشف تشخيصية.

تقع الميزة الأساسية لأنظمة نواقل التعبير من الفيروس العصوي (BEVS) بمقدرتها على إنتاج كميات كبيرة من البروتينات المأشوبة المتغايرة وتأمين التعديلات الضرورية التي تطرأ على البروتين في خلايا حقيقية النوى، مثل الفسفرة phosphorylation، وأسْيَلة الأحماض الدهنية، وإرتباط الغليكوزيل بالأوكسيجين من أجل تحقيق الفعالية البيولوجية المثلى، باستثناء (وهو الوحيد) ارتباط الغليوكزيل بالآزوت؛ إذ يبدو أنه غير تام في خلايا الحشرات، وذلك يعود جزئياً، إلى غياب أنزيمات الغلايكوترانسفيراز glycotransferases المناسبة وذات المستويات الفعالة. وعلى سبيل المثال، تنتهي البروتينات السكرية عند البعوض بثمالة المانوز، وبذلك قد تكون مستمنعة مقارنة بالبروتين السكري الطبيعي لدى الثدييات الذي ينتهي بحمض السياليك. كما تختلف عادةً الغلايكانات glycans (مركّبات سكرية) التي تتصل ببروتينات مأشوبة منتجة بواسطة نظام نواقل التعبير من الفيروس العصوي (BEVS) من منتجات الثدييات الطبيعية، وباستطاعتها أن تؤثر في وظيفتها (وظيفة البروتينات المأشوبة) بالعديد من الطرق.

ولذلك يبقى السؤال: إذا كانت تعديلات ما بعد الترجمة (مثلاً ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت في خلايا الحشرات) غير كافية، فما هو الداعي إلى استبدال أنظمة تعبير الثدييات المطورة أساساً بأنظمة نواقل التعبير من الفيروس العصوي (BEVS) والإجابة عن ذلك هي أن خلايا الحشرات تمتلك عدة ميزات مقارنة بخلايا الثدييات وهي: سهولة زرعها، وإمكانية التلاعب الجيني فيها، وتحملها الأكبر للتناضح Osmolarity (مثلاً في المحاليل الملحية)، والتركيز الأقل للفضلات الناتجة منها، وتعبيرها لمستويات أعلى من الـــ DNA لدى تعريضها للإصابة بفيروس عصوي مأشوب. بالإضافة إلى ذلك، إن الفيروسات العصوية، التي تستخدم في إصابة خلايا حشرات محددة هي كبيرة نسبياً مقارنة بنواقل التعبير البلازميدية التي تستخدم مع البكتيريا (انظر الفصل الرابع). وبناء على ذلك، يمكن للفيروسات العصوية أن تتكيف مع القطع المدرجة الكبيرة من الـــ DNA بدون الإضرار بمقدرتها على إصابة خلايا الحشرات. وهكذا يمكن للمدرجات من الـــ DNA أن تكون كبيرة بما فيه الكفاية لتتضمّن عدة جينات جديدة تشفر لسلسلة من البروتينات المرتبطة وظائفياً. أيضاً، من الميزات الأخرى لأنظمة نواقل التعبير من الفيروسات العصوية (BEVS) هي قدرة خلايا الحشرات على النمو بشكل جيد في المزارع المعلقة (انظر الفقرة 1.6.22) وهذا بدوره، يسهّل زيادة إنتاج البروتينات المأشوبة في المفاعلات الحيوية على مستوى ضخم. والفيروسات العصوية هي أساساً فيروسات غير ممرضة للثدييات أو النباتات ولديها تشكيلة محدودة من العوائل، حيث ينحصر ذلك في أنواع محددة من اللافقاريات. لذلك يمكن التعامل مع خط خلايا الحشرات المصابة بهذا الفيروس ضمن شروط احتواء مخبرية دُنيا، حيث إنها لا تشكل أي خطر على العاملين في أي مرحلة من مراحل عملية الإنتاج.

وبالرغم من ذلك، فإن أنظمة التعبير هذه ليست مثالية ولديها عيوب معيّنة بعيداً عن عيوبها المتعلقة بالتعديلات التي تلي عملية الترجمة. يبدو أن أحد مشاكلها الأساسية هو ارتفاع مستوى تحطم البروتينات المعبّر عنها داخل هذا النظام الذي يعود إلى الطبيعة الحالّة لأنظمة نواقل التعبير من الفيروسات العصوية

BEVS.فالمحضات[1] (Promoters) القوية جداً من بوليهيروزز وp10 (وهم الأكثر استخداماً نظام الـــ BEVS) يتم تحفيزهم في فترة متأخرة من حدوث الإصابة. لذلك من الممكن أن يظهر التعبير البروتيني المأشوب على أشدّه بعد بداية الطور الانحلالي، الذي يتضمن وجود خلايا الفيروس العصوي أو أنزيمات البروتياز بوصفها العوامل الأساسية في عمليات التحطيم. (انظر الشكل 3.22).

1.3.22 الإصابة بالفيروس العصوي في الجسم الحي

In vivo baculovirus infection

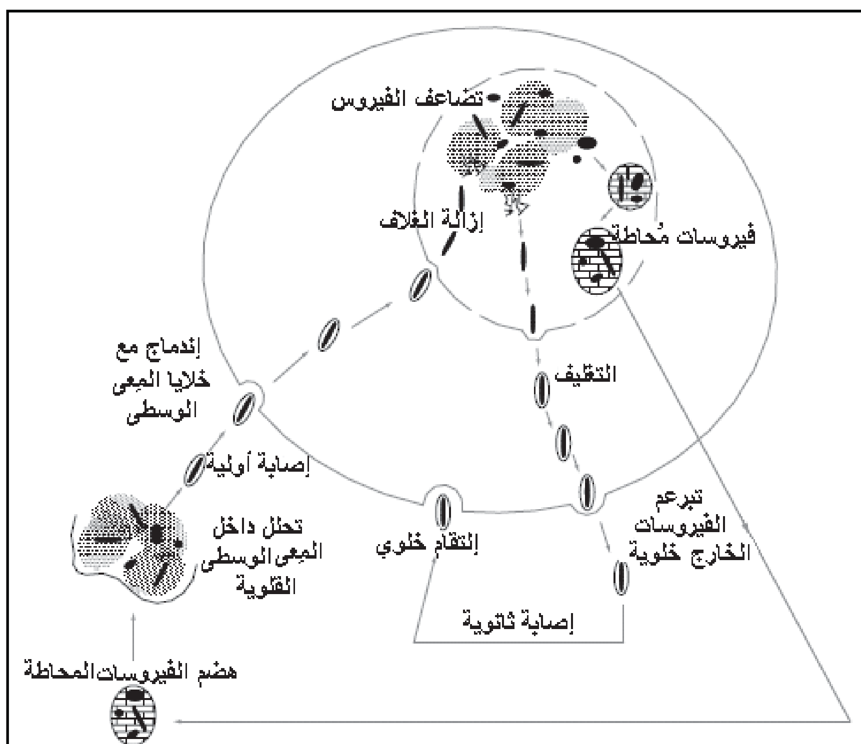
الفيروسات العصوية هي أكثر الفيروسات التي تصيب الحشرات انتشاراً. تمتلك هذه الفيروسات جزيئات DNA دائرية، مزدوجة الجديلة، وفائقة الالتفاف، مؤلفة من حوالى 120–150 كيلو زوج قاعدي، ومغلفة بغلاف بروتيني خارجي على شكل عُصَيَّة (عود) (تسمى قفيصة منواة Nucleocapsid). يتم عزل هذه الفيروسات من حشرات مصابة، وهناك أكثر من 500 فيروس عصوي معروف حالياً. والمجموعة الأكثر وفرة منها هي فيروسات عديدات الهيدروسيز Polyhedrosis، التي تنغرس فيها القفيصات النووية الفيروسية داخل أجسام مؤلفة من بروتين البوليهيدرين. ومن أكثر الفيروسات استخداماً في التعبير عن الجينات الغريبة فيروسان هما: فيروس دودة الفصة القَيَّاسة *Autographa californica* وهو فيروس نووي متعدد عديدات الهيدرين Multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNP)، وفيروس دودة الحرير *Bomyx mori* وهو أيضاً فيروس نووي متعدد الهيدرين (BmNPV).

في مثل هذه الفيروسات، تكون المحضضات التي تحرض التعبير الجيني قوية. لذلك ينتج بروتين البوليهيدرين في السلالات البرّية بمستويات عالية جداً (حتى 20% من البروتين الكلي المصنع). نشأ الاهتمام الأولي بأجسام الإحاطة المؤلفة من بروتينات البوليهيدرين عندما تم الاكتشاف أن أجسام الإحاطة المكونة

---

[1] المحض promoter: هي منطقة من الـ DNA تتحكم في التعبير عن التسلسل من DNA الذي يليها والخاص ببروتين ما (المترجم).

من بروتينات البوليهيدرين أول ما تتوجه تتوجه إلى المِعي الوسطى بعد إصابتها ليرقة الحشرة (انظر الشكل 3.22). وهناك، تحت شروط قلوية، تنحل هذه الأجسام وتطلق فيروسات منفردة لتندمج بأغشية خلايا المعي الوسطى، وتطلق القفيصات المنواة داخل السيتوبلازم. تبدأ هذه الفيروسات بالتضاعف بعد انتقالها إلى النواة، وبعد مرور حوالى 8 ساعات يتم تحرير الفيروسات المتبرعمة في دم الحشرة، حيث يمكن أن تقوم بإصابة خلايا أخرى، أو تجري إحاطتها داخل بروتينات البولهيدرين. وبعد 7 إلى 14 يوماً، تتحلل الخلايا وتموت اليرقات المكونة منها، عندئذٍ تتحرر البولهيدرينات من جسم الحشرة الميتة وتنتشر على سطح النبات ليجري تكرار الدورة من جديد.



الشكل 3.22: دورة الإصابة بالفيروس العصوي في الجسم الحي. الفرق الأساسي بين عملية الإصابة في الزجاج وتلك التي تتم في الجسم الحي، هو إزالة جين البوليهيدرين واستبداله بجين مأشوب أو قطعة مختارة من الـــ DNA المتم (cDNA). لذلك لا تتشكل أجسام الإطباق (الإحاطة) occlusion bodies ولا حاجة إلى أمعاء الحشرة من أجل تفكيك هذه الأجسام.

2.3.22 العدوى بالفيروسات العصويّة في الزجاج

In vitro baculovirus infection

إن الميزة البارزة لعملية الإصابة في الزجاج، مقارنة بالإصابة الطبيعية في الجسم الحي، هي إزالة جين البوليهيدرين من جينوم الفيروس العصوي البري، غير الضروري لتكاثر الفيروس، واستبداله بجين مأشوب أو قطعة cDNA بحسب الاختيار. إن التقنيتين الرئيسيتين المستخدمتين في تأشيب الفيروسات العصوية المأشوبة هما التأشيب المتماثل (Homologous recombination) والتبديل في الموقع المحدد (Site-specific transposition). إن التأشيب المتماثل هو عبارة عن استبدال قطعة من الـــ DNA بأخرى مطابقة لها (مماثلة) أو قريبة من التماثل بها. وتحصل هذه العملية بشكل طبيعي خلال الانقسام والتـــأشيب الانتصافي للخلية. أما التبديل في الموقع المحدد فينطوي على استخدام أنزيمات التقييد (Restriction enzymes) من أجل قص قطعة من الـــ DNA الطبيعي الموسومة بتسلسلات محددة من النيوكليوتيدات؛ عندها يمكن إدخال قطعة جديدة من الـــ DNA أو جين يمتلك أطراف تسلسلات نيوكليوتيدية مماثلة لتلك التي أُزيلت، وذلك باستخدام أنزيم لايغاز (Ligase) متخصص.

يوضع الجين المأشوب بشكلٍ شائع تحت سيطرة نسخ محضضات البوليهيدرين و p10 القوية جداً. يضمن هذا التعبير عن المنتج المأشوب (أي البروتين المتغاير) بكميات كبيرة بدلاً من التعبير عن بروتين البوليهيدرين الموجود في الحالة الطبيعية. وفي المرحلة المتأخرة جداً من دورة الإصابة بالفيروس العصوي المأشوب، خلال 20 إلى 36 ساعة من الإصابة، تتوقف الخلايا عن إنتاج الفيروسات المتبرعمة وتبدأ في التجمع والتعبير عن منتجات الجين المأشوب.

يصطلح على تسمية محضضات البوليهيدرين والـــ p10 باسم "المحضضات المتأخرة" وذلك لأنها تبدأ التعبير عن البروتينات المأشوبة بعد حوالى 24 ساعة من الإصابة. وكنتيجة لذلك، لا ينتج البروتين المرغوب بكميات كبيرة إلا بعد مضي 48-72 ساعة من بدء الإصابة (التلقيح). مما يمكن أن يقود هذا الإنتاج المتأخر إلى عطاء

منخفض من البروتين المأشوب، وذلك لأن دورة حياة الفيروس انحلالية (تتفكك الخلايا من أجل إطلاق الفيروسات). كما يمكن أن تتعرض البروتينات المأشوبة المنتجة للتحطم السريع بواسطة أنزيمات بروتيياز الخلية نفسها، التي يتم تصنيعها قبل أن يصل معدل إنتاج البروتين إلى حدّه الأعظمي. إن هذا التسلسل من الأحداث يمكن أن يؤدي إلى عدم اكتمال تعديلات ما بعد الترجمة بسبب عدم توفر الوقت الكافي للتعديل الكامل للبروتين قبل تحلل الخلية والبروتينات. لذلك، قد تكون هناك كمية من البروتين المتغاير المنتج غير فعّال حيوياً.

إن أكثر عمليات زراعة خلايا الحشرات التي تكون في الزجاج تُنفذ على دفعات في المفاعلات الحيوية (انظر الفقرة 6.22). بشكل عام، يمكن تحديد ثلاث مراحل تجري في أي مفاعل حيوي من أي نوعٍ كان:

- *طور النمو*: في هذا الطور يجري تلقيح الخلايا ضمن وسط زرع نقي في المفاعل الحيوي بتركيز يتراوح بين 2 إلى 4×10^5 خلية لكل 1 مل من الوسط، ثم يتم إكثارها إلى مرحلة منتصف أو نهاية الطور التصاعدي (الأسي) (2 إلى 3×10^6 خلية لكل 1 مل) وبعدها تُعرض للإصابة بواسطة نظام نواقل تعبير من الفيروسات العصوية BEVS مناسب.
- *طور الإصابة*: وتنفذ في مرحلة منتصف أو نهاية الطور التصاعدي (اللوغاريتمي) للمزرعة عند تضاعف معين من الإصابة Multiplicity of infection (MOI)، الذي يمكن أن يتراوح بين قيمٍ منخفضة تصل إلى 0.05 وحدة مشكلة للبلاك[2] (Plaque forming unit) (p.f.u) أي عدد الفيروسات التي قامت بإصابة خلية واحدة) وقيم مرتفعة تعادل 10 وحدات مشكلة للبلاك. إن مستوى تضاعف العدوى (MOI) هو المصطلح المستخدم في قياس مستوى إصابة المزرعة وتقدر بالوحدة المشكلة للبلاك لكل خلية. يمكن حساب تضاعف العدوى (MOI) من المعادلة التالية (من اليسار إلى اليمين):

---

[2] البلاك (Plaque): دائرة مفرغة تظهر شفافة على سطح الوسط الصلب الذي يغطيه نمو بكتيري سطحي متصل. وكل "بلاك" يمثل إصابة فيروس واحد لخلية واحدة (المترجم).

MOI (p.f.u. cell−1) = تركيز الفيروس $(p.f.u.\ ml^{-1})$

عدد الخلايا الكلي/ من التلقيح الفيروسي ml ×

تكون عطاءات البروتين عند قيم أقل لمستوى تضاعف الإصابة (MOI) متساوية، أو حتى أفضل من تلك التي تتشكل عند قيم عالية لمستوى تضاعف الإصابة، ما يؤمن تركيزات خلوية أقل وتوظيف أوقات إصابة أطول. ولكنّ فترة إصابة أطول تعني زيادة في كلفة العملية، بالإضافة إلى مشكلة تحلل البروتين ووجود كمية كبيرة من الفضلات الخلوية، مما يعقد عملية المعالجة التي تلي عملية الإنتاج. لهذا السبب يتم تشغيل العديد من عمليات الإنتاج واسعة النطاق عند مستوى عالٍ من تضاعف العدوى MOI (عند 5−10 وحدة مشكّلة للّويحة/خلية). إلا أن وضعية التشغيل هذه تتطلب كميات أكبر من المخزون الفيروسي، ما يجعل هذه العملية تتطلب تحليلاً اقتصادياً معمقاً من أجل تحديد قيمة مستوى تضاعف الإصابة MOI الأمثل.

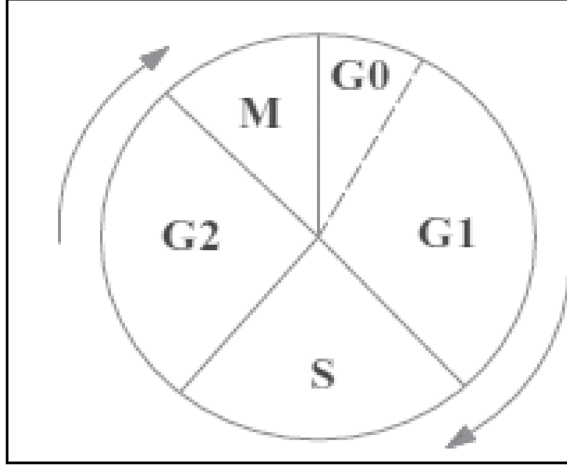
- *طور التعبير عن البروتين*: يبدأ هذا الطور عندما تتفعل "المحضضات المتأخرة" بعد 24 ساعة من الإصابة التي يتم عندها التعبير عن الجينات المأشوبة. يتأثر التعبير عن البروتين بعدة عوامل، مثل مستوى تضاعف العدوى MOI، وتركيز الأكسجين المنحل، ودرجة الحرارة. إضافة إلى الكثافة الخلوية القصوى، وهو عامل مهم لخلايا Sf-9 و Sf-21 (انظر الفقرة 3.3.22) الذي عادة ما يكون حوالى 10^7 خلية/مل، على الرغم من أنه يمكن تحقيق تراكيز أعلى للخلايا باستخدام استراتيجيات مثلى للتغذية على دفعات. يتم الوصول إلى ذروة التعبير عن البروتين بعد مرور حوالى 48−72 ساعة على الإصابة (طور التحلل)، مما يتطلب القيام بتحليل معمق لتحديد نقطة الجني المثلى التي تحقق التوازن الأفضل بين تصنيع البروتين وتحلله. إن معدل انتشار ونقل الفيروس إلى الخلايا بواسطة الحركة البراونية هو الذي يتحكم بمعدل إصابة خلايا الحشرات SF-9.وكنتيجة لذلك، يكون معدل الإصابة متناسب طردياً تقريباً مع مستوى تضاعفها (MOI).

3.3.22 المنتجات التجارية من خطوط خلايا الحشرات

Commercial products from insect cell lines

إن تكنولوجيا خلايا الحشرات/الفيروسات العصوية المستخدمة في الإنتاج التجاري للبروتينات المأشوبة على مستوى ضخم، تُعد نسبياً حديثة مقارنة بتكنولوجيا الخلايا الثديية. لذلك هناك القليل جداً من الأعمال المنشورة عن العمليات على المستوى الصناعي التي تتضمن أنظمة نواقل تعبير من الفيروسات العصوية BEVS. ولكن، الخلايا الأكثر استخداماً في تطبيقات أنظمة نواقل التعبير من الفيروسات العصوية BEVS معروفة باسم Sf-9 وSf-21 ، وهما نوعان من الخلايا التي تم عزلها من نسيج المبيض عند حشرة *Spodoptera frujiperda*(هي حشرة فراشة دودة الخريف من فصيلة حرشفية الأجنحة)، وخلايا Tn-368 وHigh-Five BT1-TN-5B1-4 ، المعزولتين من حشرة دودة الملفوف القياسة *Trichplusia ni*. كما استخدمت بنجاح خطوط خلوية أخرى من الحشرات، مثل SL-2 و SL-3 (المعزولتين من ذبابة الخل *Drosophila melanogaster*، انظر الجدول 4.22) في إنتاج بروتينات مأشوبة، مثلاً الأنزيم بيتا–غلاكتوزيداز. تستخدم هذه الخطوط الخلوية (SL-2 و SL-3) بشكل متكرر لنمذجة التعبير البروتيني المأشوب على نطاق واسع في خلايا الحشرات.

الجدول 4.22:	**خطوط خلايا الحشرات الأكثر استخداماً في التقانة الحيوية**
الخط الخلوي	**مصدره من الحشرات**
Sf-9, Sf-21	نسيج المبيض لحشرة دودة الخريف *Spodoptera frujiperdo*
Tn-365	حشرة دودة الملفوف القياسة *Trichoplusia ni*
High-Five BT1-TN-5B1-4	حشرة دودة الملفوف القياسة *Trichoplusia ni*
SL-2, SL-3	ذبابة الخل Drosophila melanogaster



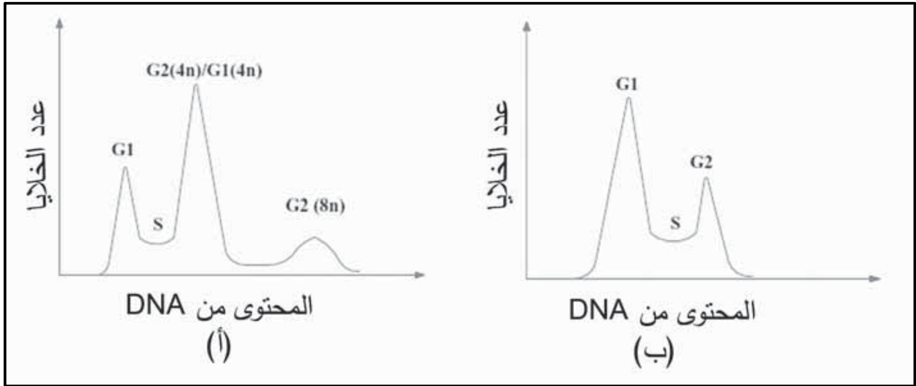
الشكل 4.22: دورة الانقسام الخلوي لخلايا حقيقيات النوى. تدعى الفترة الفاصلة بين الانقسامات الانشطارية الخيطية (mitotic)، أي تلك التي تفصل بين خلية إبنة وأخرى أم، الدورة الخلوية. تتألف دورة الخلية من أربعة أطوار أساسية: طور الراحة الأول G1 (Gap1 phase)، وهو طور تصنيع البروتين؛ وطور التصنيع Synthesis (S phase)، وهو طور تصنيع الـــ DNA؛ وطور الراحة الثاني G2 phase (Gap 2)، وهو طور ما بعد التصنيع أو ما بعد الانقسام الخيطي؛ الطور M.

4.22 دورات الثدييات والحشرات الخلوية

تدعى الفترة الفاصلة بين انقسامين خيطيين، أي تلك التي تقع بين الخلية الأم والخلية البنت، *الدورة الخلوية* (انظر الشكل 4.22). تتألف الدورة الخلوية من أربعة أطوار رئيسية: الطور G1 (Gap1)، وهو طور تصنيع البروتين؛ والطور S ، طور تصنيع الـــ DNA؛ والطورG2 (Gap2)، طور ما بعد التصنيع أو ما قبل الانقسام الخيطي؛ وأخيراً الطورM ، طور الانقسام الخيطي. إن الوقت اللازم لإتمام الدورة الخلوية هو حوالى 24 ساعة، ولكن هذا يعتمد على طبيعة الخط الخلوي المستخدم. إذ يمكن لبعض خطوط خلايا الثدييات (مثلاً الخلايا الكبدية، وغيرها) أن تغادر دورة الخلية في الطور التحضيري الأول G1 ، حيث تدخل في الطورG0، أو طور "السبات". وتعتبر هذه الظاهرة كنتيجة لكبح الجينات اللازمة للانقسام الخيطي. بعض الخلايا الموجودة في طورG0 هي خلايا متمايزة بشكل

نهائي، أي أنها لن تدخل أبداً في دورة الإنقسام الخلوي، ولكنها ستؤدي وظيفتها المحددة حتى مماتها. إلا أنه يمكن لبعض الخلايا الأخرى الموجودة في الطور G0 (مثلاً الخلايا اللمفاوية) أن تعاود الدخول في دورة الانقسام الخلوي إذا ما تعرضت للمحفز المناسب (أي مستضد مناسب).

يعود الطور G1 إلى طور الاستقرار (التحضيري) و S-G2 إلى مرحلة النمو/الانقسام الناشط (الطور التصاعدي) في مزارع الخلايا الحيوانية؛ في حين أنه لدى خلايا الحشرات (مثلاً Sf-9)، يكون طور الراحة في مرحلة G2. خلال نمو الخلية الحشرية، تزداد بداية نسبة الخلايا في طور G1 والطور S، بينما تنخفض في الطور G2 . وخلال منتصف الطور التصاعدي، تزداد الخلايا الموجودة في الطور G2 بينما تنخفض في الطورين G1 و S. ويلاحظ عكس هذا السلوك في جميع خطوط خلايا الثدييات التي تمّت دراستها حتى الآن. إن دورة انقسام خلايا الحشرات (وخاصة خلايا Sf-9 و Sf-21) هي أكثر تعقيداً من دورة انقسام خلايا الثدييات من حيث إمكانية تمييز دورتي انقسام منفصلتين. في الأولى، هناك الدورة الطبيعية لانقسام خلية ثنائية الصيغة الصبغية، G1 (2n)، S و G2 (رباعية الصيغة الصبغية 4n)؛ ولكن، في الثانية، هناك دورة انقسام خلية رباعية الصيغة الصبغية، G1 (رباعية الصيغة الصبغية 4n)، S و G2 (ثمانية الصيغة الصبغية 8n). ويعود هذا إلى كون خطوط الخلايا Sf-9 و Sf-21 غير مستقرة من الناحية الخلوية: أي أن صبغياتها حساسة للاندماج والتشديف (التكسر) أثناء نموها في الزجاج مما يؤدي إلى ظهور تعددية الصيغة الصبغية (Polyploidy) أو الدورة الخلوية الثانية (رباعية الصيغة الصبغية). إن الفهم المعمق لموقع خلية ما أو مجتمع خلوي في دورة الانقسام الخلوية هو جزء مهم في أي برنامج بحث وتطوير، الذي يقود إلى الإنتاج الأمثل للبروتينات المأشوبة على نطاق واسع. يمكن القيام بالقياسات التي تؤمن تحديد موقع الخلايا في دورة الانقسام الخلوية باستخدام تقنية الانسياب الخلوي (Flow cytometry) ، وهي تقنية تحليلية ستتم مناقشتها لاحقاً (انظر الفقرة 5.22 والشكل 5.22).



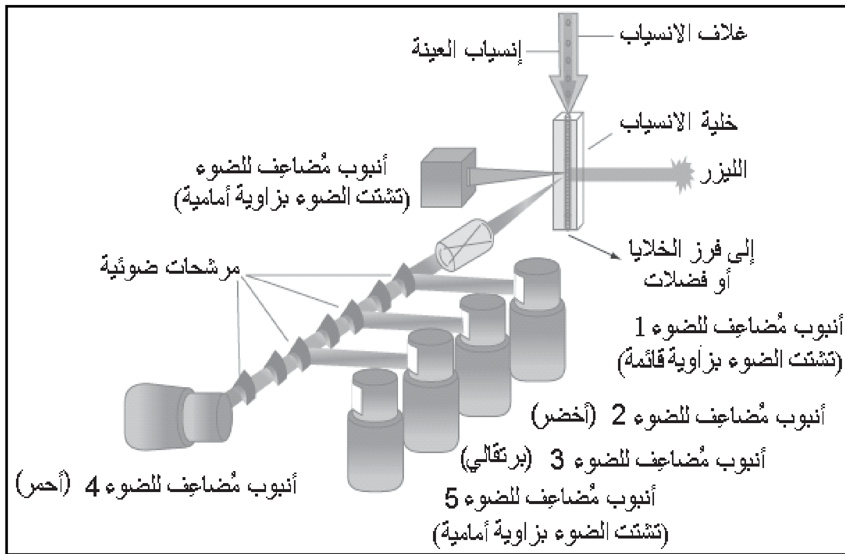
الشكل 5.22: تحليل نموذجي بواسطة تقنية الانسياب الخلوي لدورة انقسام خلية حشرات (أ) وخلية ثدييات (ب) مبني على أساس محتوى الـ DNA في خلايا منفردة. بالنسبة إلى خلايا الثدييات، تمثل القمة الأولى الطور G1 (ثنائي الصيغة الصبغية n2)، بعدها الطور S؛ وتدل القمة الثانية على الطور G2 (رباعي الصيغة الصبغية n4). أما خلايا الحشرات، فتمثل القمة الأولى الطور G1 (ثنائي الصيغة الصبغية n2)، بعدها الطور S؛ بينما تدل القمة الثانية على تداخل الطور G2 (رباعي الصيغة الصبغية n4) من دورة انقسام خلية ثنائية الصيغة الصبغية مع الطور G1 (ثُماني الصيغة الصبغية n8) من دورة انقسام خلية رباعية الصيغة الصبغية.

في بيئتها الطبيعية، عندما تشكل جزءاً من الكائن أو عندما لا تكون متكيفة لتنقسم بشكل مستمر، تتواجد خلايا الثدييات في طور الراحة الأول G1 حيث تجري عمليات الأيض وتصنيع البروتين الطبيعية. تكون خلايا الثدييات المستخدمة في معظم عمليات التقانة الحيوية متكيفة لتتكاثر باستمرار كما تكون فاقدةً للقدرة على الانسحاب من دورة الانقسام. لذلك يمكن لهذه الخلايا أن تموت من خلال آلية تدعى *(Apoptosis)* أو الموت الخلوي المبرمج ((Programmed cell death (PCD)).

كان هناك الكثير من العمل الذي أجري على خصائص موت الخلية الثديية، خصوصاً فيما يتعلق بالآلية الفعالة للموت الخلوي، أي الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) ولكن بالنسبة إلى خلايا الحشرات، فالمعلومات حول آليات موتها قليلة، بالرغم ممّا تبيّن أن بعضها مثل Sf-9 والخلايا الورمية الهجينة تشترك في بعض مواصفات الموت الخلوي المبرمج، التي تضم انكماش الخلية، وفقدانها الشكل الكروي، وانتفاخ الشبكة الإندوبلازمية وأجسام غولجي، وتكثف الكروماتين (الصبغين)، وتحطم أجزاء محددة من الـ DNA. من جهة أخرى، أظهرت فروقات

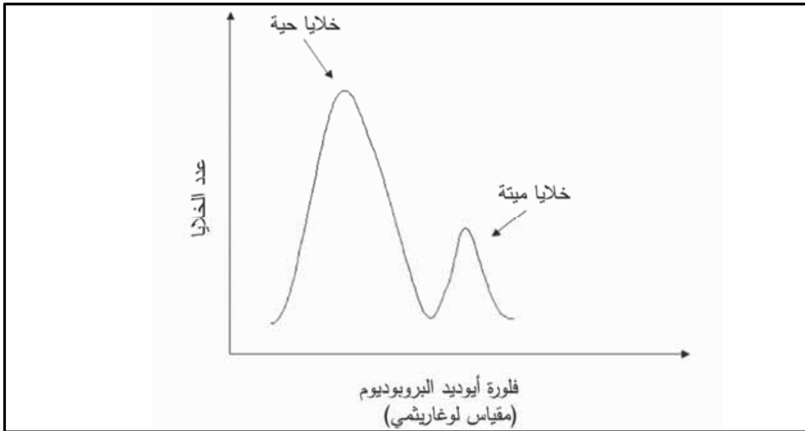
في الشكل والحركية مميزة بين هاتين المجموعتين من مزارع الخلايا، أن الخلايا-Sf 9 ماتت عن طريق عملية موت خلوي مبرمج غير نموذجية تميزت بغياب تشدُّف (تكسير) النواة، وارتباط ضعيف للكروماتين المتكثف بغلاف النواة، وانتفاخ المتقدّرات وتشدُّف عالٍ لأجزاء غير محددة من الــ DNA. لم تشاهد هذه الصفات المميِّزة للتنكرز (عملية موت سلبية)، في عملية الموت المبرمج الطبيعية التي تمر بها الخلايا الورمية الهجينة. إن الموت الخلوي المبرمج في مزرعة خلايا الحيوان هو مشكلة خاصة غالباً ما تقود إلى عمليات حيوية مبتورة وإلى عطاء قليل من المنتج الحيوي. يرتبط مثل هذا الموت الخلوي المبرمج في أغلب الأحيان بمحدودية المغذيات والمصل اللازمين، بالإضافة إلى الإجهاد الناجم عن ميكانيكية السوائل أو غياب أحد عوامل النمو. يجري تنفيذ أبحاث كثيرة بهدف تحديد العوامل التي تتحكم بالموت الخلوي المبرمج بحيث يمكن تجنب تأثيراتها خلال زراعة الخلايا.

5.22 تقنية قياس الانسياب الخلوي Flow cytometry



الشكل 6.22: مخطط توضيحي لجهاز قياس الانسياب خلوي. تمر الخلايا عبر مركز حزمة شعاع الليزر حيث يتم استجلاء الضوء المتشتت بزاويتين. يقاس تشتت الضوء بزاوية أمامية ضمن نفس مستوى (مسطح) الشعاع وبزاوية قائمة عند 90 درجة من الانحراف عن حزمة الليزر. كما يقاس أيضاً عند زاوية 90 درجة الضوء المنبثق عن صباغات متفلورة، التي تمتلك مواقع ارتباط داخل/وخارج الخلية، وذلك بواسطة أنابيب تضخيم ضوئية.

قياس الانسياب الخلوي (Flow cytometry) هي تقنية تحليلية استخدمت ولا تزال بشكل مكثف في دراسة مزارع الخلايا الحيوانية، حيث إنها تقنية قوية لتوصيف المجتمعات الخلوية بشكلٍ سريع عن طريق استخدام الضوء المتشتت (انظر الشكل 6.22). تمر الخلايا منفردة من خلال شعاع ليزر، ويتم استجلاء الضوء المتشتت (المبعثر) نتيجة لذلك على مستويين. يقاس تشتت الضوء بزاوية أمامية (FALS) (Forward angle light scatter) ضمن نفس مستوى (مسطح) الشعاع وهو يمكن أن يعطي معلومات نسبية عن حجم الجسيم (الخلية). أما تبعثر الضوء بزاوية قائمة (RALS) (Right angle light scatter) فيقاس عند زاوية 90 درجة من الانحراف عن حزمة الليزر وهو يزودنا بمعلومات عن حُبَيْبية الخلايا أو خصائص انكسار الضوء لهذه الخلايا. كذلك يقاس الضوء الصادر عن صباغات متفلورة، التي تمتلك مواقع ارتباط داخل/وخارج-خلوية، عند زاوية 90 درجة.



الشكل 7.22: تحليل نموذجي لقابلية نمو مزرعة خلايا من حقيقيات النوى بواسطة التدفق الخلوي. إن جميع الخلايا محاطة بالغشاء السيتوبلازمي. لا يمكن أن توجد خلية من غير غشاء سيتوبلازمي سليم وفعال بشكل كامل. لذلك يمكن استخدام الصباغات المتفلورة التي تمتلك مواقع ارتباط داخل خلوية، ولكن لا يمكنها عبور الغشاء الخلوي السليم (مثل أيوديد البروبيديوم)، كمقياس لقابلية نمو الخلايا، أي أن تلوّن الخلية بصبغة أيوديد البروبيديوم يشير إلى موت الخلية.

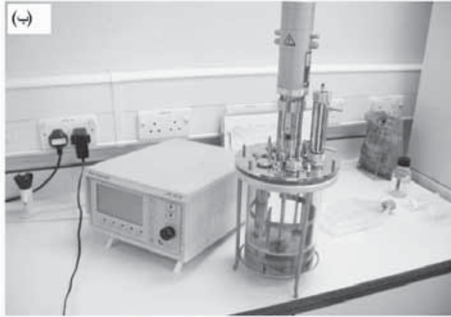
تزودنا هذه المعطيات، مقرونة بالقدرة على تمرير آلاف الخلايا في الثانية، بالمعلومات عن الدورة الخلوية في وقت حصولها (Real-time) المُعتد بها إحصائياً (انظر الشكل 5.22)، وعن فاعلية الخلية وقابليتها للنمو (انظر الشكل 7.22) على مستوى الخلية المنفردة. والمهم هنا، أنه يمكن فرز الخلايا مباشرة بعد تحليلها بحيث يمكن عزل مجتمعات ثانوية منها أو حتى خلايا منفردة من أجل متابعة تحليلها أو استكشافها.

إذا ما استخدمت مواد أولية، لإنتاج البروتين المأشوب المختار، أو منتجات تنشأ من جراء عمل هذا البروتين، بهيئةٍ متفلورة، فإنه يمكن عندها انتقاء الخلايا ذات الإنتاجية العالية، مما يعزز بشكل كبير فعالية البرنامج التطويري لأي خط خلوي. لقد استخدمت العديد من طرائق الانسياب الخلوي في تحليل دورة انقسام الخلية. بشكل عام، تستخدم صباغات متفلورة نوعية تجاه الـــ DNA (مثل صبغة هيست 33342، وصبغة 4،6–ثنائي أميدينو–2–فينيل إندول (DAPI) ، وغيرها) مع الخلايا المؤهلة لتصبح نفوذة من أجل قياس المحتوى المحدد من الـــ DNA لخلايا منفردة وتحديد طور الانقسام الخلوي. يمكن أيضاً الحصول على معلومات مشابهة باستخدام صبغات متخصصة بالأحماض النووية (مثلاً صبغة أيودايد البروبيديوم) وذلك بعد المعالجة بأنزيم تقطيع الـــ RNase RNA (انظر الشكل 5.22).

تحاط جميع خلايا حقيقيات النوى بالغشاء السيتوبلازمي، مما يتيح لها التواصل الانتقائي مع بيئتها المتاخمة. لا يمكن للخلية أن تتواجد بدون غشاء سيتوبلازمي سليم وكامل الفاعلية. لذلك،

يمكن استخدام الصباغات المتفلورة التي تمتلك مواقع ارتباط داخل خلوية محددة، ولكن لا يمكنها عبور الغشاء الخلوي السليم (مثل أيودايد البروبيديوم) كمقياس لقابلية نمو الخلايا، أي أن تلوّن الخلية بصبغة أيودايد البروبيديوم يشير إلى موت الخلية (انظر الشكل 7.22). يمكن استخدام صبغات أخرى، مثلاً رودامين 123 أخضر الوميتوتراكر لقياس الفعالية (الأيضية) للميتوكوندريا، في حين يمكن استخدام صبغة أكريدين البرتقالي لتتبع موت الخلية إما عبر الموت الخلوي المبرمج أو من خلال التنكرز.





الشكل 8.22: الدوارق الغازلة (أ) و مفاعل حيوي مخبري سعة 5 ليتر (ب) يستخدمان بشكل روتيني في زراعة خلايا الحشرات والثدييات.

6.22 اعتبارات في هندسة العملية الحيوية

Bioprocess engineering considerations

1.6.22 تقنيات زراعة الخلايا Cell culture techniques

كلتا مجموعتي الخلايا، خلايا الحشرات وخلايا الثدييات يمكن تنميتها في مزرعة معلقة حرة (قوارير جهاز الحادلات (الدحرجة)، أو دوارق T ، أو دوارق دوارة، أو أحواض مستمرة التحريك أو مفاعلات حيوية ذات المصاعد الهوائية، انظر الأشكال 8.22 و9.22). وكما هي الحال بالنسبة إلى خلايا الجراثيم، يمكن زرع هذين النوعين من الخلايا إما في مزارع الدفعة أو مزارع الدفعة المغذاة أو المزارع المستمرة، إذ تنطبق عليها العديد من المبادىء العامة للزراعة الخلوية (انظر الفصل السادس). في المعلقات الحرة، تأخذ كلٌّ من خلايا الحشرات والثدييات شكلاً كروياً بقطر يتراوح بين 5 و20 ميكروميتراً، مع كون خلايا الحشرات أكثر قرباً إلى الحد الأعلى لهذا المقياس. تعتمد بعض خطوط الخلايا على توفر مَرْسى؛ أي أنها تحتاج إلى سطح لتنمو عليه، الذي يمكن أن يكون

سطحاً بلاستيكياً أو زجاجياً. كما يمكن أن يكون جدار المفاعل الحيوي، مثلاً، زجاجات جهاز البكرات، أو دوارق T (انظر الشكل 8.22)، أو حوامل مجهرية معلقة (انظر الجدول 5.22 والفقرة 6.6.22).

تؤمن الحوامل المجهرية مساحة نمو لكل وحدة حجم من الوسط أكبر من تلك التي يوفرها نظام النمو الخلوي الأصلي. ولكن، في جميع الحالات، يحتاج المهندس إلى تأمين نظام معقم ومغلق من أجل تكاثر الخلايا وتصنيعها للمنتج المختار. تتم المحافظة على الخلايا عن طريق تخفيفها (تمريرها) بوسط جديد حتى تركيز يبلغ حوالى 4×10^5 خلية/ميلليليتر (وهذا يعتمد على نوع الخط الخلوي)، كل ثلاثة أيام تقريباً. ستلتصق الخلايا التي تحتاج إلى سطح داعم بقوة على الحوامل المجهرية أو على سطح الزجاجة/الدورق بواسطة قالب ذي أساس بروتيني جيلاتيني تفرزه الخلايا. لذلك، ومن أجل عبور (تمرير) ناجح للخلايا يضاف أنزيم التربسين، وهو أنزيم حال للبروتينات، لمساعدة الخلايا على الانفصال عن السطح الذي تلتصق عليه. يمكن للخلايا التي تنمو في معلق أن ترتبط أيضاً بسطوح الوعاء، ولكن في هذه الحالة يمكن فصلها وإزالتها بسهولة عن طريق خضِّها. يمكن لخطوط الخلايا، أثناء عملية العبور التسلسلية، أن تحتفظ بالفعالية الحيوية المرغوبة لفترة تصل حتى ثلاثة أشهر. تتلقى مثل هذه الخلايا أثناء وجود داخل الحشرة أو الحيوان الذي تنتمي إليه، المغذيات من جهاز الدورة الدموية. لذلك، عند زراعة هذه الخلايا في الزجاج يجب أن توفر بيئة النمو مغذيات وشروط فيزيائية مماثلة (درجة الحرارة، والمناضحة، والرقم الهيدروجيني، وتركيز كلٍّ من الأكسجين وثاني أكسيد الكربون) لتلك الموجودة لدى الكائن الذي كانت فيه.

إن التركيب الدقيق لأوساط النمو المستخدمة في زراعة مثل هذه الخلايا هو سر محفوظ؛ والوصفات لهذه الأوساط معروفة فقط للشركات المتخصصة في إنتاج أوساط الزرع، حيث تخضع أحياناً لحقوق الملكية. إلا أن معظم أوساط الزرع تقريباً هي قائمة على أساس دارئ ملحي ذي مناضح ورقم هيدروجيني صحيحين، وعلى احتوائها على كميات متنوعة من الغلوكوز، والأحماض الأمينية، والفيتامينات وعوامل نمو أخرى. تتم أمثلة كل وسط نمو وهو غالباً ما يكون

متخصصاً في خط خلايا محدد، حيث يضاف عليه الغلوتامين، خاصة إذا كان وسط خلايا ثدييات، وذلك بكميات أكبر من الأحماض الأمينية الأخرى، لأنه يمكن استخدامه ليس فقط كمصدر للنيتروجين، ولكن أيضاً كمصدر للطاقة وكمركب سالف بنائي (انظر الفصل الثاني). وبذلك قد يقود غيابه إلى نقص في النيتروجين واستنزافٍ سريع للأحماض الأمينية من وسط الزرع. لكن احتمال حدوث هذا هو أقل بالنسبة إلى خلايا الحشرات، إذ إنه من المعروف أن معدل استهلاك خلايا Sf-9للغلوتامين هو عُشْر استهلاك خطوط خلايا الأورام الهجينة.

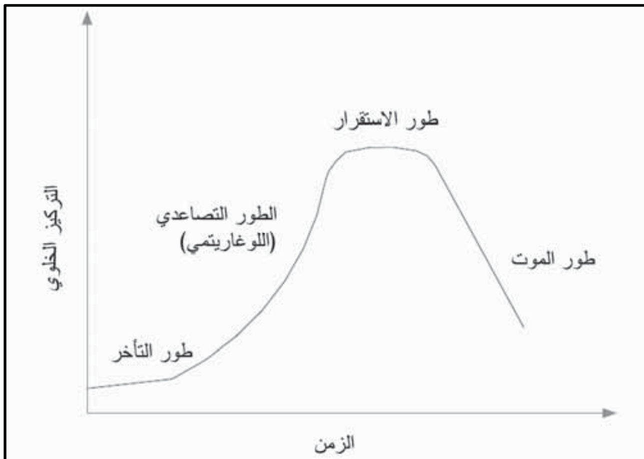
يتم اللجوء مراراً، وبصورة خاصة عندما لا تعرف عوامل النمو الموجودة في أوساط الزرع، إلى إضافة كمية من مصل الدم (وغالباً من دم عجول البقر أو أجنتها) لهذه الأوساط. يزوّد هذا المصل وسط النمو بآثار عناصر من عوامل نمو متفرقة ودهون فيزيد أيضاً المقدرة الدارئة للوسط، وفي نفس الوقت يقوم بحل المعادن الضرورية غير المنحلة مثل الحديد.

وبسبب المشاكل المُدركة والمرتبطة بفيروسات (مثلاً فيروس نقص المناعة المكتسبة HIV) والبريونات (وهو العامل المسبب للمرض الدماغي الإسفنجي عند الأبقار، Bovine spongiform encephalopathy BSE) ذات أصل حيواني، فإن بإمكانها إصابة الإنسان المستخدم النهائي لها عبر تناوله المنتجات الدوائية لمزارع الخلايا الحيوانية. حالياً، يتم التخلي عن استخدام مصل الدم في أوساط النمو المستخدمة لأهداف علاجية تدريجياً، وفي المقابل يجري تطوير أوساط خالية من المصل على نحوٍ سريع. تتشابه السلبيات الأخرى لاستخدام إضافات المصل مع تلك المرتبطة باستخدام أوساط نمو معقدة وغير معروفة في أنظمة تعبير خلايا ذات نواة أولية، من حيث إنها وبسبب التنوع في الدفعات المستخدمة، يصبح من الصعب التنبؤ بأدائها، كما أن المعالجات التي تلي الإنتاج والخاصة لاسترداد المنتج وتنقيته تصبح أكثر تعقيداً. إضافة إلى كون عوامل التحكم غير معروفة لمن ينفذ الاختبار في أغلب الأحيان.

هناك أيضاً تقارير تشير إلى أن مصل العجل الجنيني يحمي الخلايا ممّا يدعى قوى "الاحتكاك" واندماج الفقاعات في المفاعلات الحيوية المهواة التي يتم

تحريكها. هذه المواضيع مُستعرضة بشكل مفصل فيما بعد (انظر الفقرات 4.6.22 و 5.6.22). أما فيما يتعلق بالمعايير المستخدمة في معظم التطبيقات فإن الرقم الهيدروجيني pH المناسب لخطوط خلايا الحشرات (رتبة غمدية الأجنحة) يقع ضمن المجال 6 و 6.4، بينما لخطوط خلايا الثدييات فيقع ضمن المجال 6.7 و7.9. كما أن درجات الحرارة المثلى التي يحددها أيضاً الخط الخلوي المستخدم، فهي تتراوح لدى خلايا الثدييات بين 36 و38 درجة مئوية، في حين أنها تقع بين 25 و30 درجة مئوية لدى خلايا الحشرات. تستغرق عملية الدفعة النموذجية خمسة أيام حيث يصل تركيز الخلايا النهائي خلال هذه الفترة إلى حوالى 5×10^6 خلية لكل مليليتر (انظر الشكل 10.22).

إن الفرق الأيضي الأساسي بين خلايا الحشرات وخلايا الثدييات هو في تراكم اللاكتات lactate في وسط النمو. فعلى العكس من خلايا الثدييات التي تتميز بنسبة غلوكوز/لاكتات منخفضة في المزارع المتقطعة، فإن خلايا الحشرات يتراكم فيها اللاكتات بتراكيزمنخفضة، ولا تتأكسد إلا كمية صغيرة من الغلوكوز إلى غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2. فخلايا Sf-9 لا تنتج اللاكتات في الوسط، حتى مع وجود تركيز ابتدائي عالٍ من الغلوكوز (50–40 mm). وقد أظهر تحليل الانسيباب (الجريان) الأيضي لخط الخلايا Sf-9 أنها تمتلك دورة حمض ليمون ثلاثي TCA كاملة.



الشكل 10.22: منحنى النمو العام لخلايا حقيقية النواة في مزارع الدفعة.

الجدول 5.22: الخصائص الفيزيائية لبعض الحوامل المجهرية المستخدمة كثيراً في زراعة خلايا الحشرات والثدييات

الحامل المجهري	الخط الخلوي	متوسط حجم الجسيم (µm)	حجم المسام (µm)	كثافة الجسيم ($g\ ml^{-1}$)	المادة	الاستخدام
سَيْتوبور 1[أ] (أمرشام بيوساينس) Cytopore 1 (Amersham Biosciences)	خلايا تتطلب معدل إعادة دوران وتوافر للمغذيات عاليين مثلاً CHO	230، القَطْر	30	1.03	تشابك سللوز مع قطن مغطى بطبقة من DEAE[ب]	الأحواض المزودة بخلاطات، مزارع التنقيط
سيتوبور 2 [أ] (أمرشام بيوساينس) Cytopore 2 (Amersham Biosciences)	خلايا اعتمادها حقيقي على سطح داعم، مثلاً BHK	230، القَطْر	30	1.03	تشابك سللوز مع قطن مغطى بطبقة من DEAE	الأحواض المزودة بخلاطات، مزارع التنقيط
سيتولين 1 (أمرشام بيوساينس) Cytoline 1 (Amersham Biosciences)	خلايا جيدة الارتباط، وأقل حساسية للاحتكاك، وتتطلب معدلات إعادة دوران عالية، مثلاً CHO	السماكة، 500–1000 الطول، 2500–1700	400–10	1.32	عديد الإيثيلين والسيليكا	مفاعلات مسيّلة القعر
سيتولين 2 (أمرشام بيوساينس) Cytoline 2 (Amersham Biosciences)	خلايا ذات ارتباط أقل بالسطوح، أكثر حساسية للاحتكاك وتتطلب معدلات إعادة دوران أقل، مثلاً الخلايا الورمية الهجينة	السماكة 500–1000 الطول، 2500–1700	400–10	1.03	عديد الإيثيلين والسيليكا	متنوع

سيتوديكس 1 (أمرشام بيوسايناس) CytodexI (Amersham Biosciences)	خلايا اعتمادها حقيقي على سطح داعم، مثلاً BHK	القطر، 190	غير متوفر	1.03	ديكستران متشابك مع مجموعات DEAE[b] فعالة	مزارع الأحواض المزودة بخلاطات
سيتوديكس 3 (أمرشام بيوسايناس) Cytodex 3 (Amersham Biosciences)	خلايا اعتمادها حقيقي على سطح داعم، مثلاً BHK	القطر، 170	غير متوفر	1.04	ديكستران متشابك مغطى بطبقة من الجيلاتين	مزارع الأحواض المزودة بخلاطات
كلتيسفير–G[ج] (بيرسيل من خلال سيغما) Cultispher-Gc (Percell via Sigma)	معظم الخطوط الخلوية	القطر، 130–380	20	1.04	جيلاتين خنزيري متشابك	متنوع
كلتيسفير–S (بيرسيل من خلال سيغما) Cultispher-Sc (Percell via Sigma)	معظم الخطوط الخلوية	القطر، 130–380	20	1.04	جيلاتين خنزيري متشابك	متنوع

(أ) الفرق الرئيسي بين سَيْتوبور 1 وسَيْتوبور 2 هو في كثافة الشحنة، وهي 1 ملي مكافيء/غرام و 1.8 ملي مكافيء/غرام على التتالي.

(ب) داي إيثيل أمينو إيثيل Diethylaminoethyl.

(ج) الفرق الرئيسي بين كلتيسفير–G وكلتيسفير–S هو في استخدام إجراءات مختلفة في تشبيك الكلتسفير –S، وهو بذلك يملك ثباتاً حرارياً وميكانيكياً أكبر. وهي يجب أن تستخدم لأهداف هندسة الأنسجة كداعم للمواد المزدرعة، حيث يمكن انحلال الداعم كلياً بواسطة أنزيمات التحلل.

(انظر الفصل الثاني) في غير ظرف الأنوكسيا (نقص الأكسجين)، إذ يتم تحويل الغلوكوز إلى البيروفات (Pyrovate) من خلال عملية تحلل السكر (Gylcolysis)، ثم يدخل بعدها في دورة حمض الليمون الثلاثي TCA (من أجل إنتاج كميات أكبر من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP) بدلاً من المسار اللاهوائي الذي ينتج منه اللاكتات. يوضح هذا المسار السبب في كون استهلاك الأكسجين من قبل الخلايا الورمية الهجينة أعلى 6 إلى 8 مرات من استهلاك خطوط خلايا Sf-9 للأكسجين الذي يتلازم مع احتياجات للأوكسيجين بنسب أعلى من 2–3 مرات لدى الخلايا الورمية الهجينة. من ناحية أخرى، وبشكل معاكس، يتراكم اللاكتات في خلايا هاي– فايف (High-five) بتراكيز تتراوح بين 16-7 mm في المزارع المعلقة. لذلك، قد يرتبط تأثير اللاكتات المثبط، لكل من خلايا الثدييات والحشرات، بنوع الخلايا المستخدمة.

إن الأمونيا هي منتج آخر من منتجات الهدم الهامة في مزارع الخلايا الحيوانية. كما أن خلايا الحشرات ليست بنفس حساسية خلايا الثدييات لوجود الأمونيا. فإن خلايا Sf-9 لا تتراكم فيها الأمونيا خلال نموها، على العكس من خلايا هاي– فايف التي يتم فيها ذلك وبتراكيز تعتمد على المحتوى الابتدائي للغللوتامين والأسبرجين في الوسط.

2.6.22 إنتاج البروتينات على مستوى كبير

Large-scale protein production

حتى فترة قريبة كانت المفاعلات الحيوية بحجم 8000 ليتر كافية لسد حاجة الطلب على البروتينات العلاجية العالية القيمة المنتجة من خلايا الثدييات. ولكن، مع وصول بعض المنتجات الآن إلى السوق، في حين أن بعضها الآخر ما زال في المرحلة الأخيرة من التجارب السريرية، فإن مثل هذه الأحجام أصبحت غير كافية، ويجري حالياً الترخيص لمفاعلات حيوية تجارية يصل حجمها إلى

20000 ليتر. لا تزال تكنولوجيا خلايا الحشرات لإنتاج البروتينات المأشوبة على مستوى ضخم حديثة نسبياً مقارنة بتكنولوجيا خلايا الثدييات. لذلك نادراً ما يزيد حجم المفاعلات الحيوية المستخدمة في المختبرات على 5–10 ليتر، في حين تستخدم أحجام 60 ليتراً أو أكثر في الصناعة. ومع ذلك، لا يوجد أي سبب للاعتقاد أن الطلب على منتجات مزراع خلايا الحشرات سيكون، في المستقبل، أقل منه على مزارع خلايا الثدييات في الوقت الحاضر.

تمثل عملية الزيادة في الإنتاج عادةً المرحلة الأخيرة في برنامج البحث والتطوير مما تؤدي إلى تصنيع المنتجات المأشوبة من خلايا الثدييات والحشرات على مستوى ضخم. وعلى عكس الأنظمة الجرثومية، يتخلل عدد من الخطوات عمليات زيادة الإنتاج في كل من خلايا الثدييات والحشرات. في البداية، تنقل الخلايا من مزرعة مستقرة إلى مزرعة دوارق هزازة أو دوارق دوارة (انظر الشكل 8.22). وقد صمّمت الأخيرة (الدوارق الدوارة) أساساً من أجل التحريك المعتدل لمزارع الحوامل المجهرية، ولكنها تستخدم الآن روتينياً في جميع المزارع. هذه الدوارق الدوارة هي مزوَّدة بأدوات تحريك مركبة من الأعلى، تُحرّك مغناطيسياً ومعلّقة بحيث تأخذ حيزها في التحريك فوق قعر الدورق بقليل. في بعض الأحيان عندما يتم نقل الخلايا إلى وسط جديد من أجل تلقيحه فإن ذلك يترافق مع نقل قليل من وسط الزرع المستَهلك الذي قد يحتوي على عوامل نمو مفرزة ضرورية لتحفيز النمو من جديد. في المقابل، يمكن أن يحتوي هذا الوسط المستَهلك أيضاً على فضلات سامة أو مثبتة للخلايا، وبذلك يجب إزالتها بواسطة الطرد المركزي، ليكون ممكناً استخدام هذه الخلايا المنقولة بعد ذلك لتلقيح المفاعل الحيوي (انظر الشكل 8.22). وبما أن عامل زيادة الإنتاج انطلاقاً من الدورق أو الزجاجة (حيث يكون الرقم الهيدروجيني غير مضبوط) إلى المخمر لا يزيد على 5:1، أي استخدام ملقح بنسبة 20% (حجم/حجم)، فإنه قد يكون هناك حاجة إلى عدد من خطوات زيادة الإنتاج من أجل الحصول على حجم الإنتاج المطلوب. لذلك، وفي هذا الإطار، فقد تم استخدام كل من مزارع الدفعات المتقطعة، التي تضاف فيها كميات من الوسط الجديد دورياً، والمزارع المستمرة، التي تضاف فيها كميات من الوسط الجديد بشكل مستمر بمعدل محدد مسبقاً، حيث يكون

النظام مغلقاً في كِلا هذين النوعين من المزارع. وبهذه الطريقة (أي المستمرة)، يمكن التغلب على المشاكل المرتبطة بالتثبيط الهدمي أو محدودية (نقص) الأكسجين عن طريق التغذية المستمرة بالمغذيات المضبوطة بنسب صحيحة، فقد سُجلت كثافات خلوية (حوالى 10^7 خلايا لكل مليليتر) وتراكيز أعلى للمنتج مع استخدام هذه الطريقة مقارنة بعملية الإنتاج المتقطعة المقابلة.

لقد أشير إلى استخدام المزارع المستمرة بشكل رئيسي في الدراسات الوظيفية حيث إن هذه العمليات غير مرغوبة في الصناعة بسبب طول فترة الزراعة (تصل حتى خمسة أسابيع). إذ يمكن أن يؤدي هذا الوقت الطويل إلى عدم استقرار خطوط الخلايا وإلى زيادة في خطر التلوث أو والتكسر الميكانيكي. إن التعديل على العملية المستمرة هو الزراعة بالتنقيط. ففي أثناء نمو الخلايا وانقسامها يتم احتواؤها ضمن المفاعل الحيوي ميكانيكياً (من خلال مرشح دوار، أو ألياف مجوفة، أو بالطرد المركزي) أو بالموجات ما فوق صوتية. كما يتم إضافة الوسط النقي (الجديد) في الوقت الذي يزال فيه الوسط المستهلك (وبالتالي أي منتج مفرز أو أي فضلات سامة أيضاً تُزال). لقد سُجل بهذه الطريقة كثافات خلوية تعادل حوالى 3×10^7 لكل مليليتر، بالإضافة إلى تراكيز للمنتج أكثر بعشر مرات من تلك التي تم التوصل إليها بواسطة عمليات الزرع المتقطعة. ومع ذلك، فإن بعض المشاكل قد تحدث بسبب انسداد أو تلوث المرشحات الدوارة أو الألياف المجوفة.

3.6.22 انتقال الكتلة والطلب على الأكسجين

Mass transfer and O_2 demand

إن الأكسجين هو مطلب ضروري للكائنات التي تتنفس هوائياً، وهو قليل الانحلال في المحاليل الملحية الضعيفة مثل أوساط النمو (حوالى $1.1\ mmol\ l^{-1}$ أو $33\ mg\ l^{-1}$ عند حرارة 35 درجة مئوية) لذلك هناك حاجة إلى إضافته بشكل مستمر إلى الوسط. إن كِلتا مجموعتي الخلايا، خلايا الثدييات وخلايا الحشرات بحاجة إلى كميات متساوية تقريباً من الأكسجين وذلك ضمن المجال 10^{-17} إلى

10^{-16} mol في الثانية لكل خلية، مع كون خلايا الحشرات أقل حاجة بقليل من خلايا الثدييات. من جهة أخرى، بعد تعرضها للإصابة، فإن خلايا الحشرات تتضاعف، بشكل عام، حاجتها إلى الأكسجين. على المستوى التجاري، تميل كثافة الخلايا القصوى لكِلا النوعين لأن تكون متشابهة، وذلك تقريباً ضمن إطار 5 10^6 xخلية لكل مليليتر، ولكن استخدام تقنية الزراعة بالدفعة المغذاة على نفس المستوى زادت كثافة الخلايا إلى حوالى 10^7 خلية لكل مليليتر. إن نطاق مستوى الأكسجين المنحل الذي يمكن عنده زرع خلايا الثدييات بحيث تكون مكتفية هو بشكل عام واسع، إذ يتراوح بين 5 إلى 100% من درجة إشباع الهواء. بينما في خلايا الحشرات فإنه أضيق ويتراوح بين 40 إلى 60%، أما فيما عدا ذلك فتصبح خلايا الحشرات متشابهة مع خلايا الثدييات. إن احتياجات الخلايا للأكسجين يجب تلبيتها بشكلٍ كامل طوال فترة عملية الزراعة (بما فيها مرحلة ما بعد الإصابة) بواسطة معدل انتقال الأكسجين الذي يعتمد بدوره على مُعامل الانتقال الشامل للخلايا $k1a$ ، والقوة المحركة لهذا الانتقال (انتقال الكتلة).

يعتمد معامل انتقال الكتلة $k1a$ فقط على متوسط معدل طاقة البعثرة النوعية ε_T ، المحتمة على نظام الزرع من خلال الدافعة الميكانيكية (المُسَيِّر) من جهة وسرعة الهواء السطحية في المفاعل [(vs= (vvm/60 حجم المرق/مساحة المقطع العرضي للمفاعل الحيوي)] من جهة أخرى. وبذلك يجب أن تكون طاقة البعثرة النوعية ε_T وسرعة الهواء السطحية Vs بصورة مجتمعة، كافيتين لتأمين معامل انتقال الكتلة $k1a$ الضروري. إن المعادلات اللازمة لتحديد قيمة هذه المعامِلات متوفرة في مراجع أخرى غير هذا، ولكن من المفيد ذكر تعليقين آخرين هنا؛ أولهما، فيما يتعلق بالكثافات الخلوية التي يمكن الحصول عليها حتى الآن على المستوى التجاري، فإن الحاجة إلى الأكسجين، وبالتالي معامل انتقال الكتلة $k1a$هو منخفض جداً في حالة مخمرات خلايا الثدييات والحشرات مقارنة بعمليات التخمير الجرثومية. وثانيهما، أن اختيار المِحراك (الفصل السابع) لا يغيِّر العلاقة بين معامل انتقال الكتلة $k1a$ وطاقة البعثرة النوعية ε_T وسرعة الهواء السطحية

Vs. من الواضح، أنه لا يتوجب أن يؤدي هذا المستوى من التحريك وشدة التهوية إلى أي تغيير مهم في مقدرة الخلايا على النمو وتوليد المنتج المنشود.

4.6.22 أثر الإجهاد الميكانيكي الناجم عن التحريك

Impact of mechanical stress arising from agitation

إن خلايا الثدييات والحشرات، وبسبب عدم امتلاكها للجدار الخلوي، هي غير حصينة للتغيرات في المناضحة (خلايا الحشرات هي أكثر حصانة) إضافة إلى حساسيتها "للاحتكاك"، أي أنها تتحطم فيزيائياً بتأثير الدافعة الميكانيكية (المُسَيِّر) المستخدمة في المفاعلات الحيوية. وكنتيجة لذلك، فإنه من الموصى به تاريخياً استخدام قوة تحريك منخفضة جداً (يعبّر عنها بـــطاقة البعثرة النوعية ε_T وتقدر بالواط لكل كيلو غرام من وسط الزرع ($W\ kg^{-1}$)، وبحسب ما هو موصى فيجب أن تكون حوالى $0.01\ W\ kg^{-1}$). بدورها، تؤدي شروط التحريك هذه إلى تغاير في تراكيز الأكسجين O_2 وثاني أكسيد الكربون CO_2 المنحلين، وخاصة لدى الرقم الهيدروجيني pH القائم أثناء العمل على مستوى ضخم. لهذه الأسباب، كان هناك، خلال الثمانينيات من القرن الماضي، العديد من المحاولات لإدخال أنظمة أخرى، مثل نظام المصعد الهوائي (انظر الفصل السابع)، والألياف المجوفة، ودوران القعر المسيَّل (من أجل الخلايا التي تحتاج إلى سطح داعم). ومن المدرك الآن أن هذا القلق المتعلق بحساسية الخلايا للاحتكاك كان مبالغاً فيه وأن غالبية العمليات الصناعية تستخدم مفاعلات حيوية بنظام المعلقات الحرة وأحواض مزودة بخلاطات خاصة في حالة المفاعلات ذات الإنتاج واسع النطاق. وفي حالة الخلايا المعتمدة على سطح داعم في نموها، تستخدم مفاعلات حيوية مزودة بخلاطات وحوامل مجهرية. ولكن، على اعتبار أن الخلايا الحيوانية يمكن أن تكون أكثر حساسية للتحريك والتهوية في المفاعلات الحيوية ذات الأحواض المزودة بخلاطات مقارنة بالخلايا الجرثومية، فقد بُذل جهد كبير من أجل الحصول على التصميم والتشغيل الأمثل للمفاعلات فيما يتعلق بالتحريك والتهوية.

تشغل عمليات التخمير البكتيرية النموذجية عند قيم من ε_T (طاقة البعثرة النوعية) تعادل 1 إلى 2 واط لكل كيلو غرام من وسط الزراعة، في حين استخدمت المفاعلات الحيوية القديمة المزودة بخلاطات والمخصصة لخلايا الثدييات قيم لــ ε_T من درجة (ترتيب) 0.01 واط للكيلوغرام الواحد. ومع ذلك، فإن طيفاً واسعاً من خلايا الثدييات (مثلاً، خلايا الأورام الهجينة، وخلايا النخاع العظمي الورمية، وخلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO)) ستنمو وتنتِج بشكل جيد في مزارع من غير ضخ للهواء حتى عند قيم ε_T تعادل 0.2 واط للكيلوغرام. إن مثل هذه الزيادة في قوة التحريك، من 0.01 إلى 0.2 واط للكيلوغرام، ستؤمن زيادة تعادل أربعة إلى خمسة أضعاف في معامل انتقال الكتلة $k1a$. وقد تمت أيضاً تنمية خلايا الحشرات Sf-9 عند قيم ε_T تصل حتى 0.25 واط للكيلوغرام.

ولكن، تشير دراسات أجريت في دوارق دوّارة (انظر الشكل 8.22) مع خلايا الحشرات بأن تلفاً يمكن أن يحصل لهذه الخلايا بسبب إمكانية حدوث احتكاكات بين الخلاط وقعر الحوض. من الممكن عند قوة تحريك تصل إلى 0.2 واط للكيلوغرام، وعلى مستوى المخمرات المخبرية، الحصول على مستويات كافية من نقل الأكسجين إلى السطح العلوي لأوساط الزرع بدون إدخال فقاعات الهواء، أي بدون ضخ الهواء، كما يمكن الحصول على كثافات أعلى للخلايا باستخدام هواء مخصب بالأكسجين.

يمكن أن تقاس قوة الخلايا باستخدام تقنية التلاعب الدقيق، التي أكدت أنه بإمكان الخلايا أن تتحمل تحريكاً أكثر حدّة (وبصورة مهمة) ممّا كان يظن أساساً. وقد أجريت دراسات التحريك هذه منذ البداية باستخدام توربينات ذات الانسياب الشعاعي (التي غالباً ما يطلق عليها خطأً اسم الدافعات ذات الاحتكاك العالي، انظر الفصل السابع) حيث كانت النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها عندما استخدمت الدافعات المحورية (أو ما يطلق عليها اسم الدافعات منخفضة الاحتكاك، انظر الفصل السابع). إن العديد من الباعة، خصوصاً المفاعلات حيوية مخبرية مخصصة للاستخدام مع خلايا الثدييات والحشرات، ما زالوا يدعون تزويد هذه

المخمرات بدافعات منخفضة الاحتكاك. مع ذلك، لا يوجد هناك أي دليل يشير إلى أن هذه الدافعات تحسن الأداء حقيقةً عندما تجرى المقارنة على أساس طاقة البعثرة ε_T.

5.6.22 أثر الضخ الهوائي واستخدام مزيل التوتر السطحي بلورونيك F68

Impact of sparging and the use of pluronic F68

مع ازدياد حجم عملية الزراعة الخلوية، يصبح من الضروري ضخ الهواء مباشرة داخل وسط الزرع (خاصة عند خلايا الحشرات في مرحلة ما بعد الإصابة) وذلك من أجل المحافظة على المستوى المرغوب به من تركيز الأكسجين المنحل. إن أي تلف ميكانيكي تتعرض له الخلايا المعلقة بشكل حر هو بسبب انفجار الفقاعات المتشكلة عند سطح الوسط. لقد أظهرت برامج نمذجة ديناميكية سائلة للفقاعات المنفجرة وجود معدلات طاقة بعثرة نوعية بصورةٍ موضعية عالية (10^4 إلى 10^5 واط للكيلوغرام) مرتبطة بالفقاعات. وهذا أكبر بعدة أضعاف من المعدلات المرتبطة بالتحريك. كما تظهر النمذجة أيضاً أن الفقاعات الأصغر تعطي معدلات طاقة بعثرة نوعية ε_T أكبر، وبالتالي فإن الخلايا تتعرض لإجهادات عالية جداً إذا ما كانت ملتصقة بهذه الفقاعات.

ولكن، وكما تبين في العام 1968، أن استخدام مزيل التوتر السطحي بلورونيك F68 (Pluronic F68) يزيل هذا التلف الحاصل للخلايا، وذلك عن طريق منع التصاق بين الخلايا والفقاعات وتخفيض التوتر السطحي للوسط بحيث لا تعاني الخلايا مثل هذه الإجهادرات الموضعية. بالإضافة إلى ذلك، يمكن للبلورونيك F68 أن يقدم حماية بيولوجي عن طريق اندماجه بأغشية خلايا الحشرات وتقويتها، التي تنمو وتنتج بشكل أفضل بوجود بلورونيك F68 حتى عندما لا يكون هناك حاجة إلى ضخ الهواء.

لقد جاء إدراكنا، أن الفقاعات المنفجرة هي السبب الرئيسي في تلف الخلايا، متأخراً جداً ليمنع استخدام المصاعد الهوائية والمفاعلات الحيوية العمودية، لأنها كانت تعتبر مفاعلات ذات قوى "احتكاك ضعيفة". أيضاً، وبسبب المشاكل المدركة المتمثلة بالاحتكاك الذي يولده التحريك، غالباً ما تستخدم مفاعلات حيوية مزودة بخلاطات منظمة للانسياب. ولكن تحت هذه الظروف، حتى عندما تكون قيم طاقة البعثرة النوعية ε_T منخفضة، فإن الفقاعات تُمتص بسهولة إلى داخل وسط الزرع بسبب الدوامات المتشكلة: ومثل هذه الفقاعات هي أيضاً متلفة للخلايا عندما تنفجر، لذلك تستمر الحاجة إلى استخدام بلورونيك F68، ويكون العمل بدون منظمات الانسياب لا يقدم أي ميزة بل قد يتسبب في مصاعب.

6.6.22 استخدام الحوامل المجهرية The use of microcarriers

إن العديد من خطوط الخلايا الحيوانية لا يمكنها التأقلم مع المزارع المعلقة، وغالباً ما تنمو بالتصاقها على حوامل مجهرية (انظر الجدول 5.22). إن الحوامل المجهرية هي جسيمات ذات أشكال وأحجام متنوعة (تتراوح بين 2mm و 100μm) يمكنها دعم كثافات خلوية عالية عن طريق تقديمها مساحة سطحية ضخمة من أجل نمو الخلايا التي تحتاج إلى سطح داعم. كذلك، فهي قادرة على الحفاظ على بيئة فيزيائية متجانسة وتأمين فصل سهل نسبياً للخلايا عن وسط النمو في نهاية العملية.

ولكن المشكلة الأساسية هي أنه من الممكن إزالة الخلايا بسهولة عن أسطح الحوامل المجهرية بسبب التحريك، حيث تترافق إزالة الخلايا هذه بفقدان الخلايا الحية، وبالتالي الإنتاجية. تؤمن الحوامل المجهرية ذات المسامات الكبيرة بعض الحماية للخلايا حيث يمكن للخلايا اختراق هذه المسامات والنمو على الأسطح الداخلية. ولكن، ومن أجل الاستفادة القصوى من هذه الميزة، يجب أن يكون حجم الفراغ الداخلي صحيحاً، ويسمح بنقل الأكسجين إلى الخلايا وثاني أوكسيد الكربون بعيداً عنها. لذلك، فإن الهدف الأساسي من الزراعة على الحوامل المجهرية هو

الحصول على كثافة خلوية قصوى بدون التأثيرات السلبية الناجمة عن التحريك. إذ يجب تأمين نقل مناسب للأوكسيجين وتعليق ملائم للحوامل المجهرية.

يمكن الإبقاء على قوة تحريك كافية للمحافظة على تعليق الحوامل المجهرية عند قيم طاقة بعثرة نوعية ε_T أقل من تلك التي يحصل عندها تلف الخلايا، وذلك باختيار رقاقات مائية ذات ضخّ سفلي (انظر الفصل السابع) مقترنةً بمحيط قاعدة المفاعل الحيوي، وأيضاً باختيار استراتيجية تغذية مناسبة للوسط حيث يمكن الوصول إلى بيئة مفاعل حيوي جيدة التحريك. وقد يكون هناك حاجة إلى مستويات أعلى من التحريك، التي قد تسبب تلفاً للخلايا، إذا ما كانت عملية التزويد بالأوكسيجين تتم فقط عن طريق التهوية السطحية خاصة عند العمل على نطاق واسع أو عندما تكون هناك حاجة إلى كثافات خلوية عالية.

7.6.22 البيئة الفيزيائية والكيميائية

physical and chemical environment

عندما تزرع خلايا الثدييات والحشرات عند سرعة تحريك منخفضة يصبح من الصعب الحفاظ على تجانس الوسط في المفاعلات الحيوية المستخدمة الإنتاج على نطاق واسع. وبدوره، فإن نقص التجانس يعني تحريكاً ضعيفاً للوسط وضبطاً غير دقيق للرقم الهيدروجيني. غالباً ما يوضع مِجسّ جهاز قياس الرقم الهيدروجيني قريباً من الدافع الميكانيكي، وعند الحاجة تضاف كربونات الصوديوم بتركيز 3M عند سطح الوسط. ونتيجة لذلك، تكون الطبقات العليا من المفاعل الحيوي غير ممزوجة جيداً، مما يؤدي إلى أن تكون قيمة الرقم الهيدروجيني تحت سطح الوسط أعلى بشكل مهم منها في الجسم الوسط ككل.

أظهرت دراسات مخبرية قامت بتدوير خلايا ورمية ووسط الزراعة بين مفاعلين حيويين مخبريين مزودين بمضخات هوائية، حيث كانت قيمة الرقم الهيدروجيني لأحدهما 7.3 والآخر 8 أو 9، أن الخلايا عندما تتعرض لحركة

دائرية منتظمة عبر مناطق ذات رقم هيدروجيني مرتفع، يكون هناك زيادة هامة في موت الخلايا (حوالى 30%). إن التزويد بالعامل الضابط للرقم الهيدروجيني قريباً من الدافع الميكانيكي باستطاعته إزالة مثل هذه التغيرات في الرقم الهيدروجيني مع ما يشكله هذا من ميزة واضحة في تشغيل المفاعلات الحيوية؛ إلا أنه نادراً ما يحصل هذا.

من أحد عواقب استخدام معدلات تهوية منخفضة بغية منع تشكل الفقاعات الذي يرتبط بتلف الخلايا هو التراكم المحتمل لثاني أوكسيد الكربون المنحل الذي قد يصل إلى تراكيز سامة والمترافق بازدياد في ضغط توازن الموائع (الذي يحصل في المخمرات الضخمة بسبب عمق الوسط السائل). إن خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) المزروعة في مفاعلات حيوية مخبرية بإمكانها أن تتحمل تراكيز معتدلة من ثاني أوكسيد الكربون المنحل (حتى درجة 18% من الإشباع بثاني أوكسيد الكربون المنحل)، في حين اكتشفت في المفاعلات الحيوية الكبيرة الحجم تأثيرات مثبطة عند درجة 14% من الإشباع بثاتي أوكسيد الكربون المنحل. يتأثر معدل ثاني أكسيد الكربون المتراكم في الوسط بالاستراتيجية المستخدمة في تحديد تركيز الأكسجين المنحل (التهوية السطحية، ضخ الهواء، والضغط الجزئي للأكسجين في مدخل الغاز). لذلك، هناك حاجة إلى تحقيق توازن بين التزويد بالأكسجين، وإزالة ثاني اكسيد الكربون وضبط الرقم الهيدروجيني.

7.22 قراءات إضافية **Further reading**

Alberts, B., A. Johnson, and J. Lewis [et al.], *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

Bailey, J. E. and D. F. Ollis (eds.), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

Maramorosch, K. and A. H. McIntosh, *Insect Cell Biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994.

Old, R. W. and S. B. Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 5th ed. Oxford: Blackwell Science, 1994.

Shapiro, H. M. (ed.), *Practical Flow Cytometry*, 3rd ed. New York: Alan R. Liss, 2003.

Spier, R. E. (ed.), *The Encyclopaedia of Cell Technology*. New York: John Wiley and Sons, 2000.

الفصل الثالث والعشرون

التقانة الحيوية للخلية النباتية

Plant Cell Biotechnology

روبرت فيربورتي — **Robert Verpoorte**

جامعة ليدن، هولندا — **Leiden University, The Netherlands**

هينس جي. ج تن هوبن — **Hens J. G. ten Hoopen**

جامعة ديلفت للتكنولوجيا، هولندا — **Delft University of Technology, The Netherlands**

1.23 المقدمة — Introduction

إن النباتات هي الأساس لجميع نشاطات الإنسان: فهي تقدم لنا خدمات متنوعة وعديدة باستخدامها كأغذية وعقاقير؛ وكمصدر لمواد العمارة، والألياف (في صناعة الألبسة)، والكيماويات (المركبات الكيميائية) الضخمة (كالسيليلوز، والأميلوز، والمطاط) والدقيقة (كالمنكهات، والعطورات، والمبيدات الحشرية والأصباغ). ومنذ أزمنة بعيدة، كان الناس يبحثون عن استعمالات جديدة للنباتات والمنتجات المُستخرجة منها، كما حاولوا تحسين إنتاجها. ومع قدوم التقانة الحيوية، أصبحت النباتات هدفاً مهماً للأبحاث في هذا المجال.

إن أساس جميع تطبيقات تقانة النباتات الحيوية هو مبدأ القدرة على التشكيل *(Totipotency)*. وتعني القدرة على التشكيل أن كل خلية نباتية تحمل جميع المعلومات الوراثية اللازمة لجميع وظائف النبات، وعليه يجب أن تكون، من حيث المبدأ، قادرة على النمو لتعطي نبتة كاملة من جديد.

يولي علم التقانة الحيوية الزراعية *(Agrobiotechnology)* الاهتمام بنمو النباتات كمحاصيل، كما يهدف إلى تحسين عطاءاتها أو تغيير الصفات المرتبطة بنوعيتها. وهذا يمكن القيام به عن طريق المقاربة التقليدية في الاستيلاد، التي أصبحت فيها زراعة الأنسجة النباتية أداة أساسية لتقليص مدة تطوير أنواع جديدة من النباتات بشكلٍ كبير، وبذلك يمكن إنتاج عدد كبير من النباتات المتجانسة خلال فترة زمنية قصيرة. أما الأداة الأساسية الأخرى الموظفة في تحسين النباتات فهي علم الأحياء الجزيئي (Molecular Biology). في هذه الحالة، يجري التعبير عن الجينات بإفراط، مما يعطي النباتات صفات محسنة أو صفات جديدة (ومرغوبة). فمن أجل تحسين العطاء، طُوِّر أول جيل من النباتات المحورة (المعدّلة وراثياً، Genetically Modefied (GM)) القادر على التعبير بإفراط عن الجين، مما جعل النباتات إما مقاومة للأعشاب أو مقاومة للآفات والأمراض. فمثلاً، من خلال تعديل جينوم النباتات بإدخال الجين الذي يُشفر لسُمّ BT (BT-tixin)، وهو بروتين سامّ قاتل للحشرات يتواجد في بكتيريا *Bacillus thuringeinsis* ، أصبحت هذه النباتات مقاومةً للحشرات. لقد أثارت هذه التطبيقات العديد من الأسئلة، إذ لم يكن هناك أي ميزات واضحة تدفع المستهلك إلى القبول باستهلاك هذه النباتات المعدلة وراثيا ً(GM)، ولم يتم تقبلها من المجتمع في العديد من الدول، مما سبب انتكاسة كبيرة في عملية تطوير المحاصيل الزراعية.

إن تغيير بعض الصفات النوعية ذات القيمة المضافة الواضحة بالنسبة إلى المستهلك سيكون مهمة أكثرصعوبة؛ بالرغم من النجاح في تطوير ألوان جديدة لنباتات الزينة أو الأزهار، حيث إنها لا تشكل أي خطر على الاستهلاك أو القيم. وحالياً تشكل الجينات التي تنتج مركبات متنوعة مُعزِزة للصحة، الهدف الرئيسي في التقانة الحيوية الزراعية. ويمثل الأرز "الذهبي" الذي أدخل عليه الجين المسؤول عن التصنيع الحيوي لفيتامين A، البرهان الواعد لصحة مبدأ هذه المقاربة، حيث يَنتِج هذا الأرز الآن كميات أعلى من فيتامين A، والذي يحدد بدوره حالات العمى لدى الأطفال الذين تعتمد تغذيتهم على الأرز وحده.

وللنباتات المستخدمة في الصناعة، صفات أخرى يمكن العمل عليها، مثل: تغيير نسب النوعين الرئيسيين من النشاء، الأميلوز والأميلوبيكتين في البطاطا، التي تجعل المعالجة الصناعية للبطاطا أسهل؛ وتخفيض مستويات اللغنين (Lignin) في الخشب الذي يحسن في إنتاج السيليلوز والورق، وهو ما يمكن اعتباره مثالاً آخر عن دور النباتات المعدلة وراثياً في إنتاج الكيماويات الضخمة. أما فيما يتعلق بإنتاج الكيماويات الدقيقة فتتوجه الجهود حالياً نحو مركبات سيتم استخدامها كأدوية.

تهدف *التقانة الحيوية للخلايا النباتية* إلى إنتاج الكيماويات الدقيقة بواسطة الطرائق التقانية الحيوية. ويضم هذا نمو مزارع لخلايا أو أعضاء النباتات في مفاعلات حيوية، إضافةً إلى استخدام الهندسة الوراثية من أجل تحسين العطاء من المنتجات المنشودة.

سنركز في هذا الفصل على التقانة الحيوية للخلايا النباتية كطريقة لإنتاج الكيمياويات الدقيقة. وفيما يتعلق بالتقانة الحيوية الزراعية، فنوجه عناية القارىء إلى قائمة القراءات الإضافية المدرجة في آخر هذا الفصل.

2.23 التقانة الحيوية للخلايا النباتية Plant cell biotechnology

إن النباتات هي المصدر لعدد كبير من المركبات عالية القيمة (انظر الجدول 1.23 للأمثلة). وهناك عدة أسباب أثارت الاهتمام في إنتاج مثل هذه المركبات عن طريق التقانة الحيوية:

- الحاجة إلى كميات قليلة فقط (من كيلوغرامات إلى بعض الأطنان)؛
- نمو النباتات التي تشكل مصدر المركب الحيوي في البرية، حيث يجري جمعها بإفراط مما يقود إلى احتمال انقراضها؛
- نمو النباتات التي تشكل مصدر المركب الحيوي في ظروف مناخية أوسياسية غير مستقرة، مما يتسبب في مشاكل التزويد بهذه المركبات؛

- إنتاج المركبات فقط خلال مرحلة محددة من تطور النبات؛
- نمو النباتات ببطء شديد واحتياجها إلى سنوات عدة قبل أن تصبح جاهزة للحصاد؛
- الحاجة إلى ضبط عملية الإنتاج بشكلٍ صارم من أجل تطوير منتج عالي القيمة (الممارسة التصنيعية الجيدة good manufacturing practice، GMP).

الجدول 1.23: بعض الأمثلة على مستقلبات ثانوية نباتية هامة

الأدوية	*الاستعمالات (التطبيقات)*
فينبلاستاين Vinblastine	مضاد أورام
فينكريستاين Vincristine	مضاد أورام
كامبتوثيسين Camptothecin	مضاد أورام
بودوفيللوتوكسين Podophyllotoxin	مضاد أورام
تاكسول (بكليتاكسيل) Taxol (paclitaxel)	مضاد أورام
كوينين Quinine	مضاد الملاريا
أرتيميسينين Artimisinin	مضاد الملاريا
كوينيدين Quinidine	مضاد اضطراب النظم
ديجوكسين Digoxin	مقوٍّ للقلب
مورفين Morphine	مُسكّن
كودايين Codeine	مُسكّن
Δ^9–تتراهيدروكانَبينول Δ^9–Tetrahydrocannabinol	مُسكّن
غالانثامين Galanthamine	مرض الزهايمر (Alzheimer)
كولشيسين Colchicine	داء المفاصل

هيوسيامين Hyoscyamine	مضاد الفعل الكوليني (باراسيمفاتواليتيك)
سكوبولامين Scopolamine	مضاد الفعل الكوليني (باراسيمفاتواليتيك)
كافيين Caffeine	منشط
المنكهات والعطور	
فانيلين Vanillin	مثلاً في المثلجات، ومشروبات الكولا
أحماض حشيشة الدينار المرة	صناعة الجعة (البيرة)
كابساسين Capsaicin	الفليفلة الحارة
الزيوت العطرية Essential oils	مزيج معقد من التربينويدات تُستعمل في
المينثول Menthol	السكاكر
الغلوكوسينولات Glucosinolates	الخردل
المبيدات الحشرية	
الأزاديراكتين Azadirachtin	
البيريثرينات Pyrethrins	
الأصبغة	
أنثراكوينونات Anthraquinones	
نافثاكوينونات (شيكونين) Naphthoquinones (shikonin)	
أنثوسيانينات Anthocyanins	
إنديغو Indigo	
مستقلبات ثانوية أخرى	
الكوكايين Cocaine	
النيكوتين Nicotine	
الشيكونين Shikonin	

تشتق المنتجات ذات الأهمية عادة من أيض (استقلاب) النبات الثانوي. ويعرَّف الأيض الثانوي لدى النباتات بأنه تلك المسارت الأيضية الخاصة بالنوع النباتي والمرتبطة بالتفاعل المتبادل بين النبات وبيئته، وليس تلك المتعلقة بعملية تأمين المركبات السالفة الأساسية لتصنيع مكونات الخلية الرئيسية (انظر أيضاً الفصل الثاني).

1.2.23 الخلية النباتية وزراعة الأنسجة Plant cell and tissue culture

لقد بُذلت أولى الجهود من أجل زرع خلايا وأنسجة النباتات في الزجاج (أي تنمية النبات في أوعية زجاجية مخبرية) منذ أكثر من 100 عام. وبعد اكتشاف الهرمونات النباتية منذ حوالى 50 عاماً، تمكن تحقيق أول نمو لأنسجة النباتات بنجاح. فقد تم بعد ذلك إدراك إمكانية مزارع الأنسجة النباتية الكامنة لإنتاج الكيمياويات الدقيقة، وسُجِّلت الجهود الأولى في إنشاء مزارع جذور النباتات عام 1954. بعدها، تطورت زراعة الأنسجة النباتية لتصبح طريقة رئيسية في الإكثار الدقيق للعديد من نباتات الزينة والأزهار على نطاق واسع، ضامنةً بذلك نوعية ثابتة من النباتات المتجانسة وراثياً والخالية من الأمراض. وبذلك فهي حالياً أكثر تطبيقات التقانة الحيوية الصناعية التجارية أهمية، حيث تنتج في كل عام مئات الملايين من النباتات بهذه الطريقة.

2.2.23 أيض النبات الثانوي Plant secondary metabolism

يمتلك كل نوع نباتي مجموعته الخاصة من المستقلبات الثانوية التي تساعده على البقاء في ظروف بيئته المحيطة. هذه المركبات هي متنوعة وتضم، من بين مسقلبات ثانوية عديدة أخرى، مستقلبات تُستخدم في جذب الملقِحات في غبار الطلع (ألوان الأزهار وشذاها) وفي الدفاع ضد الحشرات والكائنات المجهرية. تُنتج بعض هذه المستقلبات الثانوية (مثل الفايتوأنتيسيبينات Phytoanticipins) بشكلٍ أساسي، أي في كل الأوقات، في حين أن مستقلبات أخرى (مثل الفايتوأليكسينات Phytoalexins)

تنتج فقط بعد تحفيزٍ يُطلق لدى حدوث جروح في النباتات أو إصابتها بكائنات مجهرية. يعرف حتى الآن، 150000 منتج طبيعي، حوالى 80 % منها ذات منشأ نباتي. تشتق غالبية هذه المركبات من بضعة أحجار بناء: وحدة الأيزوبرينويد (Isoprenoid) (خمس ذرات كربون C_5)، ووحدة الفينيل البروبانويد Phenylpropanoid (تسع ذرات كربون C_9)، ووحدة الأسيتات Acetate (ذرتي كربون C_2) والأحماض الأمينية. إن مسار تصنيع الفينبل بروبانويد (الشكل 1.23) متطور بشكل جيد عند النباتات، حيث يتدفق 20–30% من الكربون الكلي عبر هذا المسار، وهو يقود إلى منتجات متنوعة تتراوح بين الليغنين والليغنانات Lignans ، والفلافونيدات Flavonoids والأنثوسيانينات Anthocyanins (أصباغ نباتية).

تبنى *التربينويدات Terpenoids* من وحدات خماسية الكربون C_5 (الشكل 1.23). فهناك التربينات الأحادية Monoterpenes (C_5 x 2)، والسيسكيتربينات Sesquiterpenes (C_5 x 3)، والتربينات الثنائية Diterpenes (C_5 x 4)، والستيرويدات Steroids والتربينات الثلاثية Triterpenes (C_5 x 6) والكاروتينويدات Carotenoids (C_5 x 8) الموجودين في جميع النباتات بحيث إن عدداً وافراً منها هو ذو قيمة اقتصادية كبيرة.

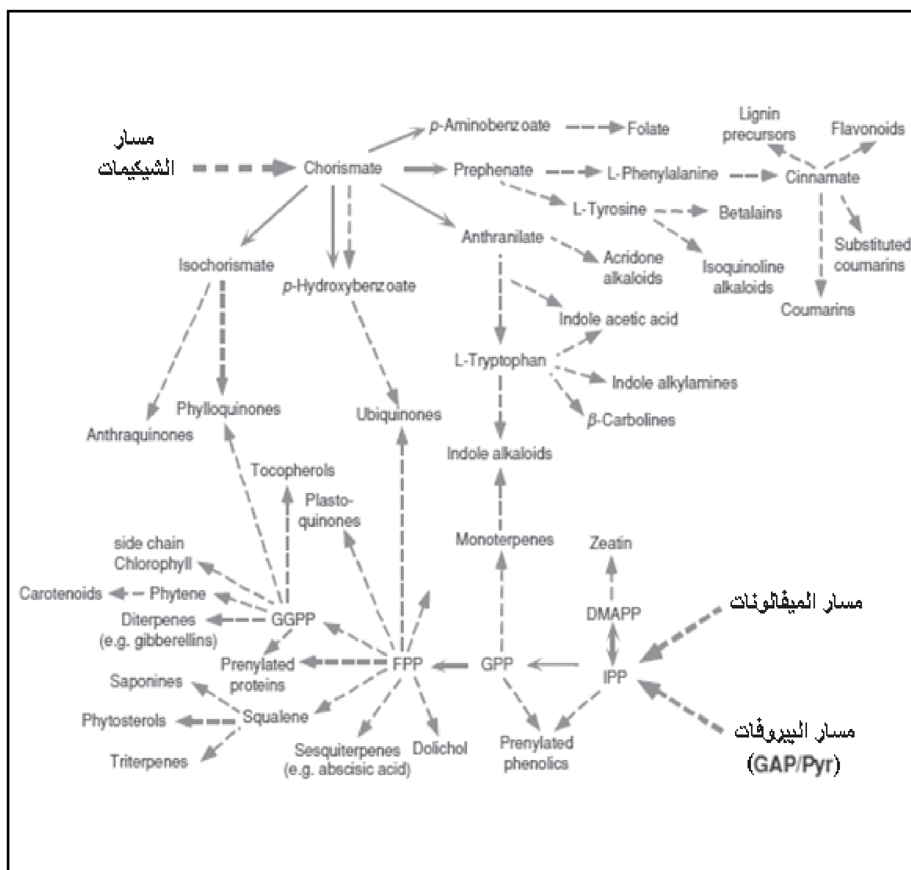
يقود مسار *الأسيتات* إلى تصنيع أشكال متنوعة من عديدات الكيتيدات (Polyketides). وبالتضافر مع مسار الفينيل بروبانويد، يقود هذا، مثلاً، إلى تشكيل الفلافونيدات (وحدة C9 + ثلاث وحدات C2) وهي مركبات صباغية عند النباتات.

الأحماض الأمينية هي مركبات سالفة للألكلويدات (Alkaloids)، التي هي صنف هام من المنتجات النباتية، تتميز بوجود الحلقات غير المتجانسة المحتوية على الآزوت.

تحتوي النباتات، عادة، على أنواعٍ مختلفة من المستقلبات الثانوية؛ بحيث يكون كلٌّ نوع مكوّناً من عدة مركبات وثيقة الصلة ببعضها البعض. وفي بعض الأحيان تتواجد مزائج مركبة، مثل الزيوت العطرية التي تحتوي على مئات من

التربينات الأحادية ترفع الأرضية. إن كل جزء من النبتة يمتلك مستقلباته الثانوية الخاصة به، ويتم تخزين هذه المركبات في بعض الأحيان بتراكيز عالية ضمن خلايا متخصصة مثل الشعيرات الغدية.

فقط حوالى 15% من أنواع النباتات هي التي تمّت، إلى حد ما، دراسة المستقلبات الثانوية فيها. كما أن مسارات التصنيع الحيوي لهذه المستقلبات هي غير معروفة بشكل جيد، وقلّة قليلة منها فقط هي التي تمّت دراستها حتى مستوى تحديد كل من المركبات الوسيطة والأنزيمات والجينات المشاركة فيها.



الشكل 1.23: مساران أساسيان للمستقلبات الثانوية في النباتات، مسار الشيكيمات shikimate ومسار التربينويد terpenoid.

3.23 تقنيات المزرعة الخلوية النباتية

Plant cell – culture technique

1.3.23 إنشاء المزرعة الخلوية Initiating a cell culture

يتم الحصول على مزرعة خلايا نباتية بقطع قطعةٍ صغيرةٍ من أي جزءٍ من النبتة وتعقيمها بشكل جيد، من دون التسبب بقتل خلايا النبتة، ثم وضعها على وسط زرعي صلب. ينمو عادةً من المادة النباتية هذه التي تدعى المزدرع (Explants)، جُسْأة (Callus) أو نُدبة (Lump) مكونة من خلايا غير متمايزة. بعد بضعة أسابيع، تُقطع الجُسأة من المزدرع وتوضع على وسط نمو صلب مناسب. ومن خلال تقطيع الجُسأة إلى قطع أصغر، وتحضينها في النهاية في وسط سائل ضمن دوارق مخروطية (Erlenmeyer) مع الهزّ المستمر، يتم الحصول على معلق من الخلايا في طور النمو. مثل هذه الخلايا المعلقة يمكن زراعتها في المفاعلات الحيوية، وباختيار توليفة خاصة من هرمونات النمو النباتية يمكن الحصول إما على جذور أو فروع نباتية تبعاً لتركيب هذه التوليفة. من حيث المبدأ، يمكن الحصول على مزارع خلوية من أي نبتة؛ أما عملياً، فيبدو أن تطوير مزارع خلوية من بعض النباتات هو أسهل بكثير من تطوير مزارع خلوية من بعضها الآخر. وبسبب مبدأ القدرة على التشكيل (Totipotency)، فإنه لا فرق من أي جزء من النبتة تم إنشاء المزرعة: في جميع الحالات سيتم الحصول، مبدئياً، على خلايا غير متمايزة، ومتجانسة وراثياً. في بعض الأحيان يمكن أن تتواجد في المزرعة خلال الأشهر الأولى من إنشائها بعض المنتجات التي تُصنّع في النبتة، ولكن فيما بعد لدى تعقيم المزرعة، تختفي هذه المنتجات. لذلك وبسبب تأثير "الذاكرة" هذا، فإنه لا يتوجب تقييم تشكل المنتجات في المزرعة الخلوية إلا بعد الحصول على مزارع مستقرة، الذي قد يأخذ 6–9 أشهر.

2.3.23 أوساط الزرع Media

لقد طُوِّرت الخلايا النباتية وأوساط زرع الأنسجة في الخمسينيات والستينيات من القرن الماضي. تعتمد معظم الأوساط المستخدمة حالياً على تراكيب

أولية، وأكثر هذه الأوساط استخداماً هي: *Murashige and Skong* (MS)، و *Gamborg B5* (B5)، (انظر الجدول 2.23)، و *Linsmaier and Skoog* (LS)، و*Schenk and Hildebrand* (SH). ويستخدم الوسط MS بشكل خاص مع إدخال العديد من التعديلات الطفيفة عليه.

تتألف أوساط الزرع مما يطلق عليه العناصر الدقيقة والعناصر الضخمة (وتشير كلمتا دقيقة وضخمة إلى الكميات)، وهي تضم أملاحاً غير عضوية ضرورية لدعم النمو. إضافة إلى ذلك تحتوي أوساط الزرع على مكونات عضوية متنوعة كالفيتامينات. تختلف الأوساط المذكورة أعلاه في نسبة المكوّنات المتنوعة الموجودة فيها. فإلى جانب هذه المجموعات الثلاث من المركبات، تحتوي الأوساط على مصدر للكربون في شكل سكر (عادة الغلوكوز أو السكروز)، الذي يستخدم من قبل الخلايا لبناء الكتلة الحيوية وكمصدر للطاقة، كونها لا تمتلك أي مقدرة على التمثيل الضوئي. أخيراً، تضاف هرمونات نمو مختلفة: أهمها الأوكسينات (Auxins) (مفيدة خاصة لتحفيز تشكل الجذور) وسيتوكينينات (Cytokinins) انظر الجدول 3.23، حيث إن كليهما يحفز تشكل الجُسْأة وتكاثر الخلايا السريع.

تحتاج المزارع الخلوية في كل نوع من النباتات إلى متطلبات محددة خاصة بها تمكّنها من النمو بصورة مثالية. كما يتطلب إنتاج مركبات محددة، شروط زرع تختلف عن الشروط المثلى للنمو. نتيجة لذلك، تم توصيف أوساط للنمو وأخرى للإنتاج حيث تُنمّى الكتلة الحيوية في أوساط النمو، وبعد ذلك تُنتَج المستقلبات الثانوية في أوساط الإنتاج.

3.3.23 مواصفات الخلايا النباتية Characterstics of plant cells

إن الخلايا النباتية هي مختلفة عن خلايا الثدييات والكائنات المجهرية. والفرق الأكثر وضوحاً هو وجود حُويصلات مركزية ضخمة في خلايا النباتات، التي غالباً ما تكون المكان الذي تتراكم فيه المستقلبات الثانوية. يلخص الجدول 4.23 بعض الصفات الأساسية لخلايا النباتات وخلايا البكتيريا

الجدول 2.23: مثالان على أوساط نمو خلايا نباتية. تتنوع هرمونات النمو النباتية من مزرعة لأخرى		
المكونات	الوسط (ملغ لكل ليتر)	
	Murashige and Skoog	Gamborg B5
المغذيات الكبيرة		
NH_4NO_3	1 650	
$(NH_4)_2SO_4$		134
KNO_3	1 900	2 500
$CaCl_2.H_2O$	440	150
$MgSO_4.7H_2O$	370	250
KH_2PO_4	170	
$NaH_2PO_4.H_2O$		150
المغذيات الدقيقة		
KI	0.83	0.75
H_3BO_3	6.2	3
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	
$MnSO_4.H_2O$		10
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	2
$Na_2MoSO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	37.3
المتممات العضوية		
ميو-إنوسيتول Myo-inositol	100	100

حمض النيكوتين Nicotinic acid	0.5	100
بيريدوكسين.حمض الهيدوكلوريك Pyridoxine.HCl	0.5	1
ثيامين.حمض الهيدوكلوريك Thiamine.HCl	0.5	1
Glycine غلايسين	2	
مصدر الكربون		
السكروز	30 000	20 000

الجدول 3.23: بعض هرمونات النمو الشائعة الاستخدام
الأوكسينات Auxins إندول-3- حمض الخل Indole-3-acetic acid (IAA) إندول-3- حمض البيوتيريك Indole-3-butyric acid (IBA) نفثالين-حمض الخل Naphthalene-acetic acid (NAA) 2،4- ثنائي كلورفينوكسي-حمض الخل 2،4- dichlorophenoxy-acetic acid (2،4D)
السيتوكينينات Cytokinins بنزيل أمينوبيورين Benzylaminopurine (BAP) سيتوكينين Cytokinin زيتين Zeatine

الجدول 4.23: المواصفات الأساسية لخلايا النبات والبكتيريا

	البكتيريا	خلايا النبات
الحجم		
القطر، ميكروميتر (μm)	10–1	200–40
السطح، ميكروميتر (μm^2)	300–3	125000–5000
الحجم، ميكروميتر (μm^3)	500–0.5	4000000–30000
النمو		
زمن التضاعف، ساعة (h)	3–0.33	75–15
معدل النمو النوعي، في الساعة (h^{-1})	2–0.2	0.05–0.01
معدل أخذ الأكسجين ($mmol\ C\text{-}mol^{-1}\ h^{-1}$)	700	15
معدل التهوية المطلوب	مرتفع	منخفض
العطاء		
C-mol biomass/C-mol C-source	0.50	0.65
مدة البقاء، في الساعة (h^{-1})	0.015	0.0075
صفات أخرى		
الحساسية للاحتكاك	منخفض	منخفض إلى متوسط
التنوع	متوسط إلى مرتفع	مرتفع
تموضع المنتج	خارج الخلية في الغالب	داخل الخلية في الغالب
الشكل	خلايا منفردة	تكتلات (تجمعات)

إن معدل نمو مزارع خلايا النباتات ليس مرتفعاً كثيراً. يبلغ أسرع تضاعف للخلايا أقل من 24 ساعة، لكنه من المألوف أن يستغرق ذلك 48–72 ساعة. تتشابه منحنيات نمو مزارع الخلايا النباتية مع تلك التي عند الكائنات المجهرية، وتتألف من طور الراحة (فترة فاصلة)، وربما طور نمو تصاعدي قصير، يليه معدل نمو خطي، وفي الختام طور السكون. يستمر النمو عادة 1–2 أسبوع، ولكن يمكن أن يكون حتى 4 إلى 6 أسابيع. وبالرغم من أن مزرعة الخلايا النباتية المعلقة المثالية يجب أن تتكون من خلايا منفردة، إلا أن معظم المزارع تحتوي في الواقع على تكتلات صغيرة (تصل حتى 20 خلية). وفي بعض الأحيان قد تصبح هذه التكتلات أكبر بكثير (بقطر 0.5–1 سنتيميتر أو حتى أكثر) ويمكن أن تبدي تمايزاً واضحاً لأنواعٍ مختلفة من الخلايا. يمكن أن تصل مزارع الخلايا المعلقة إلى 10– 20 غراماً وزناً جافاً لكل ليتر من الزرع المعلق، ولكن تحت شروط خاصة بإمكانها أن تصبح أكثر: 120 غراماً وزناً جافاً لكل ليتر (120 g DW (dry weight) l^{-1}) وهو أعلى وزن مسجل حتى الآن، فعند مثل هذه الكثافات يكون ما تبقى من الوسط الحر (الخالي من الخلايا) في المزرعة قليلاً (5- 10%).

تنمّى خلايا النباتات عادة عند حرارة 25 درجة مئوية، في الضوء أو في الظلام، إلا أن ذلك قد يؤدي إلى اختلافات في السيماءات الاستقلابية. إن استخدام الضوء في المفاعلات الحيوية للمزارع ذات النطاق الواسع غير عملي. فمن الممكن الحصول على مزارع خلوية ذاتية التغذي الضوئي (Photoautotrophic)، لكنها تُستخدم فقط في النظام التجريبي من أجل دراسة عملية التمثيل الضوئي.

إن تنوع المزارع الخلوية النباتية هو كبير، مما قد يعني فقدان الخلايا المنتجة لكميات كبيرة من المنتج هذه الصفة بسرعة. لذلك يتم حفظ خلايا النباتات بالبرودة من أجل الإبقاء على مخزون من خطوط الخلايا العالية الإنتاجية.

الجدول 5.23: بعض الأمثلة على مزارع خلوية معلقة نباتية عالية الإنتاج

النوع النباتي		إنتاج الكتلة الحيوية (غم وزناً جافاً/ليتر)	عطاء المنتج (% وزن جاف)	العطاء (غم/ ليتر)	الإنتاجية (غم/ ليتر/يوم)
Coleus blumei	حمض الروزمَرينيك (Rosmarinic acid)	25.7	21.4	5.5	0.91
Anchusa officinalis	حمض الروزمَرينيك (Rosmarinic acid)	35	11.4	4	0.16
Coptis japonica	البربرين (Berberine)	70	5	3.5	0.6
Perilla fructens	أنثوسيانين (Anthocyanins)	13.5	8.9	1.2	0.12
Papaver somniferum	سانغوينارين (Sanguinarine)	12.1	2.5	0.3	0.025
Taxus chinensis	تاكسويونانين C (Taxuyunnanine C)			0.89	0.025
Taxus canadensis	باكتيلاكسيل (Paclitaxel)			0.12	0.01
Catharanthus roseus	أجملَيسين + سيربنتين (Ajmalicine + serpentine)		1	0.23	0.008
Atropa belladona	هيوسيامين (Hyoscyamine)		0.95		0.0002
Marinda citrifolia	آنثراكوينونات (Anthraquinones)		27	3	0.4

4.3.23 إنتاج الأيضيات الثانوية
Production of secondary metabolites

لقد جرت دراسة العديد من مزارع الخلايا والأعضاء النباتية بهدف إنتاج المركبات الدوائية، والمنكهات، والعطورات، والمبيدات الحشرية والأصبغة. وتتنوعت النتائج بين انعدام الإنتاج تماماً، إلى إنتاج مستويات عالية من هذه الأيضيات الثانوية (الجدول 5.23).

ولسوء الحظ، إن إنتاج بعض المركبات الدوائية الأكثر أهمية إما لم يتم إطلاقاً أو أنه تمَّ، ولكن فقط بكميات نزرة (قليلة جداً) في المزارع الخلوية المعلقة. من ناحية أخرى، ينتج الألكلويد المسمى، بربرين (Berberine)، بمعدل 7 غرامات لكل ليتر من الزرع. أما الشيكونين (Shikonin)، وجذور الجينسينغ (Genseng) والباكليتاكسيل (Paclitaxel) (التاكسول (Taxol)) فهي أمثلة على المركبات المنتجة صناعياً بنجاح على مستوى تجاري. يمتلك التاكسول أهمية خاصة لإبدائه إمكانية تطويرعملية الإنتاج النامية تجارياً لمركبات كيميائية متخصصة مرتفعة الثمن.

يمكن أيضاً استخدام مزارع الخلايا من أجل تحويل مركبات سالفة كيميائية زهيدة الثمن إلى منتجات ذات قيمة أكبر، كما هو الدليل في تحويل الديجيتوكسين (Digitoxin) إلى ديجوكسين (Digoxin)، الذي يتطلب عملية واحدة من الهدرجة النوعية فراغياً (Stereospecific hydroxylation). وقد طُوِّر هذا إلى عملية واسعة النطاق وملائمة تجارياً، مع أنه لم يجر أبداً وضع براءة اختراع خاصة بذلك. كما نُشرت العديد من الأمثلة الأخرى ذات الأهمية التجارية، ولكن لم يتم تطوير أي منها إلى عملية تجارية.

4.23 أمثلة الإنتاجية Optimisation of productivity

تُتبع استراتيجيات مختلفة لزيادة إنتاج المركبات ذات الاهتمام بسبب الإنتاجية المنخفضة لمعظم أنظمة مزارع الخلايا النباتية. هذه الاستراتيجيات سيتم تناولها أدناه؛ فهي بشكل عام مشابهة لتلك المستخدمة في تحسين الإنتاج عندما تستخدم الكائنات

المجهرية. ولكن، على المرء ألا ينسى أنه، في حالة خلايا النباتات، يبقى دائماً الخيار البديل قائماً لدى النبتة نفسها التي تنمو في حقل الوسط من أجل إنتاج المستقلب الثانوي. تشكل الكلفة، ومرونة نظام الإنتاج والممارسة التصنيعية الجيدة GMP العناصر التي ستلعب دوراً رئيسياً في اختيار نظام الإنتاج النهائي.

1.4.23 الغربلة والانتقاء، ومن ثم أَمثَلة وسط الزرع

Screening and selection, medium optimisation

إن التوجه الأكثر تداولاً للحصول على خطوط خلوية عالية الإنتاج هو عن طريق الغربلة والانتقاء وبعد ذلك أمثلة النمو وأوساط الإنتاج. تتضمن *الغربلة* انتقاء النباتات التي تنشأ منها مزارع الجُسْأة ومزارع المعلقات الخلوية اللاحقة. في هذه الحالة، تُقاس الإنتاجية عند كل مستوى، وتستخدم السلالات عالية الإنتاج من أجل التطوير اللاإضافي. ويكمن الهدف في تحقيق إنتاج بأحجامٍ كبيرة خلال وحدة الزمن (غرام لكل ليتر من الوسط في اليوم) في مزارع المعلقات الخلوية. ولكن لسوء الحظ، لا توجد دائماً علاقة مباشرة بين النباتات عالية الإنتاج للمستقلبات في الطبيعة والمزارع الخلوية المشتقة منها لإنتاج هذه المستقلبات. إلا أنه يبدو أن هناك ارتباطاً أفضل بين مزارع الجُسْأة ومزارع المعلقات الخلوية.

أما في حالة الانتقاء، فإن التوجه يختلف؛ حيث يتم ابتكار ظروف خارجية تعطي الأفضلية لبقاء الخلايا التي تمتلك إمكانية إنتاج عالية. وينفذ ذلك، مثلاً، عن طريق إضافة مركب سامّ إلى وسط الزرع، الذي يتم إزالة سمّيّته بواسطة أحد الأنزيمات التي تلعب دوراً في المسار الحيوي لتصنيع المنتج المنشود. على سبيل المثال، استُخدم مركب الفلوروفينيل ألانين (Flourophenylaganine) لانتقاء خلايا نبات التبغ القادرة على تحويل هذا المركب بسرعة؛ إن الخطوة المحدِّدة لمعدل التفاعل في تصنيع كوفيأويل بيوتريسين (Coffeoyl putrescine) هي تلك التي تتضمن عمل الأنزيم فينيل ألانين لياز (Phynel alanine layase) (PAL) القادر على التقاط الفلوروفينيل ألانين وإزالة سُمِّيَّته. نتيجة لذلك، إن الخلايا التي تبقى حية بعد التعرض للفلوروفينيل ألانين هي تلك التي تمتلك فعالية عالية من أنزيم فينيل ألانين

ليباز (PAL) ، وبذلك تكون هي خلايا التبغ ذات الإنتاجية العالية (1.5 غرام لكل ليتر، وهذا أعلى بـــ 6–10 مرات من إنتاج خطوط الخلايا الأصلية).

يرافق إجراءات الغربلة والانتقاء مشكلة رئيسية تتمثل في عدم التمكن دائماً من الحصول على سلالة مستقرة. فبشكل عام، حوالى 50% من الحالات هي التي يتحقق فيها إنتاج خطوط خلوية مستقرة .

إن *أمثلة الوسط الزرعي* هو إجراء معقد، ليس فقط بسبب العدد الضخم من المكونات التي تدخل في هذه العملية، وإنما لكون الخلية النباتية تحتاج إلى عدة زراعات مرحلية (ربما تصل إلى 10 مرات) قبل ملاحظة التأثير النهائي الناتج من تغيير تركيب وسط الزرع. في هذه الخطوة يُفضل إعداد تجارب تعتمد إمكانية تغيير عدة معايير في نفس الوقت على تلك التي تعتمد أمثَلَة مكون (معيار) واحد في كل تجربة، مما يمكّن من تحليل متعدد المتغيرات العشوائية للنتائج. إن المكونات الأكثر أهمية التي يبدو أنها تؤثر في النمو وإنتاج المستقلبات الثانوية هي هرمونات النمو، والكربوهيدرات، ومصدر الآزوت إضافةً إلى الفوسفور. كما يجب أيضاً اعتبار شروط نمو أخرى مثل، تركيب الطور الغازي، والضوء والحرارة، كعوامل هامة أخرى.

وبما أن لكل من عملية الاستقلاب الثانوي وعملية النمو شروطها الخاصة، فإنه غالباً ما تُستخدم إجراءات على مرحلتين. في المرحلة الأولى، يكون إنتاج الكتلة الحيوية، لذلك من الضروري اختيار أوساط تحفز النمو السريع بشكلٍ خاص. وفي المرحلة الثانية (وهو طور الإنتاج)، تُنقل الخلايا إلى وسط يحفز تصنيع المستقلبات الثانوية. إن أمثلة وسط الإنتاج أسهل من أمثلة وسط النمو، إذ إن هناك حاجة إلى مرحلة واحدة فقط من الزرع المرحلي.

وبالرغم من أن هذه المقاربة تتطلب كثيراً من الجهد، إلا أنها قد ترفع الإنتاجية بمقدار 20–30 مرة. يعطي الجدول 6.23 بعض الأمثلة عن تأثيرات معالجات متنوعة في إنتاج باكليتاكسيل (Paclictaxel) في مزارع خلايا التكسوس (Taxus) .

الجدول 6.23: أمثلة على تأثيرات معالجات متنوعة في إنتاج الباكليتاكسيل Paclictaxel في مزارع خلوية لأجناس من نبات التكسوس *Taxus*

جنس التكسوس	المعالجة	مستوى الباكليتاكسيل (ميلليغرام لكل ليتر)	
		غير معالج	معالج
T. cuspidata	الإيثيلين (Ethylene)	0.02	2
	MeJ[أ]		2.7
	الإيثيلين + MeJ		3.8
	أكسجين، وثاني أكسيد الكربون وإيثيلين مُؤَمثلين	0.5	6.5
	ضوء	7[ب]	14[د]
T. chinensis	الإيثيلين (Ethylene)	1.1	0.3
	Ag^+ (مثبطات الإيثيلين) ومحفز للفطور		10.8
	محفز فطري		5.2
	حمض الأبسيسيك (Abscisic acid)	0.2	1.1
	حمض الأبسيسيك + MeJ		18
	MeJ		10.6
	إيثيلين + MeJ + سكروز	4.1	20.2
(Taxuyunanine)			
	MeJ + سكروز		18.6
	أيونات اللانثانوم (Lanthanum ions)	1.1	4.7

ضغط التناضح (سكروز + مانيتول	2.1	78.5
براسينولايد (Brassinolide)	0.28[ج]	0.6[هـ]
Ag^{+} + MeJ + شيتوسان (Chitosan)	0.9	25
نظام ثنائي الطور		5.20
تحفيز + نظام ثنائي الطور		48
نظام ثنائي الطور	3.4	12
نظام ثنائي الطور + سكر زائد + تغذية بالمركبات السالفة		16.7
حرارة	16.4	62.3
تغذية متقطعة بالمالتوز	3.8	67
Ag^{+} + تحوّل الحرارة	30.9	137.5
MeJ	28.2	110

(أ) = MeJ أو جازمونات المثيل (methyl jasmonate).

(ب) = $mg\ g^{-1}$ (خفيف).

(ج) = $0.28\ mg\ g^{-1}$.

(د) = 14 mg g-1 (معقم).

(هـ) = $0.6\ mg\ g^{-1}$.

2.4.23 زرع الخلايا المتخصصة Culture of differentiated cells

إن المستقلبات الثانويةهي، بالتعريف، منتجات التخصص؛ ولكن، في مزارع المعلقات الخلوية لا يحدث دائماً مثل هذا التخصص، ولهذا السبب أجريت الكثير من الأبحاث على زراعة الخلايا المتخصصة في الزجاج، مثل خلايا الجذور، والفروع والأجنة، باستخدام توليفات مختلفة من هرمونات النمو. تمتلك بعض مزارع الأعضاء أنماطاً من تشكيل المستقلبات الثانوية مشابهة لتلك التي تعطيها النباتات الأصلية، مثل ألكلويدات التروبان (Tropan alkaloids) من الهايوسيامين (Hyocyamine)

والسكوبولامين (Scopolamine) اللذين يُنتجان في مزارع الجذور. من الممكن الحصول على ما يدعى بـــ "الجذور الشعرية" التي باستطاعتها أن تنمو من دون هرمونات نمو نباتية، من خلال تحوير الخلية النباتية بواسطة بكتيريا الأجرعية الدرنية *Agrobacterium rhizogen*. تمتلك مزارع هذه الجذور معدلات نمو أقل نوعاً ما من معدلات نمو مزارع الخلايا المعلقة (يبلغ الوقت الأدنى لتضاعفها حوالى 35 ساعة)، لكنها تُعتبر منتِجاً جيداً لمستقلبات الجذور الثانوية النموذجية. إن المشكلة الأساسية في مزارع الأعضاء هي في الإنتاج على مستويات ضخمة. فبالرغم من تحديد مواصفات جميع أنواع المفاعلات الحيوية لزرع الجذور و/أو الفروع، إلا أن الإنتاج التجاري على مستوى ضخم باستخدام هذه الأنظمة (مزارع الأعضاء) ما زال مرتفعَ الكلفة (انظر أيضاً الفقرة 3.5.23).

يحسن *تقييد حركة* (Immobilisation) الخلايا النباتية التفاعل المتبادل بين الخلايا المتجاورة مما قد يؤدي إلى بعض التمايز، وبالتالي إلى تحسين الإنتاجية. يمكن تقييد حركة الخلايا، على سبيل المثال، عن طريق تضمين الخلايا داخل هلامات طبيعية، مثل الجينات الكالسيوم (Calcium alginate)، أو في مكعبات من رغوة عديد اليوريثين (Polyurethane). ولكن، وكما في مزارع الأعضاء، فإن العائق الرئيسي هو تكاليف زيادة الإنتاج إلى المستوى الصناعي (انظر أيضاً الفقرة 3.5.23).

الجدول 7.23: مركبات ومحاليل متنوعة تستخدم لتحسين نفوذية أغشية خلايا النبات

ثنائي ميثيل السلفوكسيد	**Dimethyl sulphoxide**
كحول فينيل الإيثيل	**Phenylethyl alcohol**
كلوروفورم	**Chloroform**
تريتون X−10	**Triton X-100**
سِتريميد	**Cetrimide**
توين 20	**Tween 20**
توين 40	**Tween 40**
توين 80	**Tween 80**

3.4.23 إفراز المنتج Secretion of product

بما أن معظم المنتجات تخزن داخل الخلايا، فقد طُوّرت طرائق لتحفيز إفراز هذه المنتجات، حيث تتجلى ميزة طرح المنتج من الخلية بتخفيض تركيزه الداخلي مما قد يزيد من إنتاجه. إن التوجه العام لتحفيز إفراز المنتج من الخلية هو إضافة عوامل تزيد من نفوذية غشاء الخلية، كالمحاليل العضوية التي تضم ثنائي ميثيل السلفوكسايد أو المنظفات (الجدول 7.23)، إضافة إلى إمكانية معالجتها بالموجات فوق الصوتية. ومن شأن إضافة طور ثانٍ من عامل الإدمصاص الصلب أو سائل غير ممزوج (الجدول 8.23) إلى المزرعة أن يوجد بؤرة تجميع للمنتج أو المنتجات مما يُحسِّن من الإنتاجية في حالات محددة، وذلك بإزالة المنتج فيزيائياً من نظام الإنتاج، وبالتالي يُمنع تفاعله مع الخلايا .

الجدول 8.23: بعض المحاليل وعوامل الادمصاص المستخدمة لتكوين أنظمة ثنائية الطور في زراعة الخلايا النباتية

المحاليل	
مايغليول	Myglyol
بارافين	Paraffin
ثنائي بوتيل الفثالات	Dibutylphthalate
ديكان	Decane
هيكساديكان	Hexadecane
ثنائي أوكتيل الفثالات	Dioctylphthalate
الأطوار الصلبة	
XAD4	
XAD7	
RP	
مبادِلات أيونية	

4.4.23 التحريض Elicitation

تُسبّب إصابة النباتات بالكائنات المجهرية تشغيل مسارات استقلاب ثانوية لمركبات معيّنة تسمَّى الداحرات *(Phytoalexins)*: وهي مركبات منخفضة الوزن الجزيئي ذات فعالية مضادة للجراثيم. لكل نوع من النباتات مجموعته الخاصة من الداحرات النباتية، وهي تضم التربنويدات، والفينيل بروبابينويدات، والألكلويدات؛ وفي الحقيقة، أي صنف من المنتجات الطبيعية تقريباً. تتشكل هذه المركبات، التي قد تكون ببتيدات أو قليلات السكر، أو هجين من الاثنين، عن طريق تحطم جدار الخلية النباتية أو من جدار الخلية الجرثومية أثناء الإصابة، كما يمكن الحصول عليها من مستخلصات الكائنات المجهرية الممرضة للنباتات أو من الكائنات العادية، كالخميرة. وكذلك، يمكن لبعض الجزيئات الصغيرة تحفيز التصنيع الحيوي للداحرات النباتية كحمض الجاسمونيك (Jasmonic acid) (وميثيل الإستر الناتج منه) العالمي. فهو يكون كإشارة أثناء استجابة النبتة للدفاع عن نفسها ضد الإصابات الجرثومية التي تتضمن تصنيع الداحرات النباتية.

بالإضافة إلى ما يدعى بالمحرّضات الحيوية (Biotic elicitor)، هناك أيضاً ما يعرف بالمحرضات اللاحيوية (Abiotic elicitors) التي تضم أيونات المعادن الثقيلة والأملاح اللاعضوية (مثلاً الفانادات (Vanadate)). كما يمكن لعوامل إجهادية، كالصدمة التناضحية أو الإشعاع فوق البنفسجي، أن تلعب دور محرضات أيضاً.

هذه المحرضات الفعالة في النباتات هي أيضاً فعالة في مزارع الخلايا النباتية. فعملية التحريض تزيد، مثلاً، إنتاج الباكليتاكسيل (Paclitaxel) (الجدول 6.23). لكنه لسوء الحظ، معظم المستقلبات النباتية ذات الأهمية ليست داحرات نباتية.

يلخص الجدول 9.23 مساوىء وميزات مقاربات متنوعة لزيادة الإنتاج.

الجدول 9.23: طرائق لتحسين الإنتاجية في مزارع خلايا النبات

الطريقة	التجارب	الميزة	المشاكل
الغربلة (Screening)	تحليل عدد كبير من خطوط الخلايا	إمكانية الزيادة لعدة أضعاف	الثباتية، طريقة شاقة
الانتقاء (Selection)	ابتكار شروط انتقاء خاصة لخطوط الخلايا	أسلوب سهل لزيادة الإنتاجية	تُحسِّن خطوة واحدة، وليس دائماً المسار بكامله
أمثلة الرسَط (Medium optimization)	تختبر مكونات أوساط مختلفة	إمكانية الزيادة لعدة أضعاف، قد يكون وسط الإنتاج ناجحاً	شاقة، هناك حاجة إلى سلسلة من المزارع المرحلية للوصول إلى وسط النمو
تقييد حركة الخلايا (Immobilisation)	اختيار نظام تقييد الحركة	أحياناً زيادة في الإنتاجية، عملية مستمرة	إجراء مكلف على المستوى الصناعي، محدودية التغذية
التحريض Elicitation	اختيار المحرض الأمثل	يمكن إحراز إنتاج مرتفع جداً مرة واحدة عند نقاط مُختارة	الداحرات النباتية ليست بالضرورة المنتج المهم
الخلايا المتمايزة (Differentiation)	إيجاد أوساط لمزارع الجذور أو الفروع	يمكن الحصول على إنتاج مشابه للإنتاج عند النبات	صعوبة استخدام مزارع على نطاق واسع
هندسة أيضية (استقلابية) (Metabolic engineering)	التعبير بإفراط عن جينات التصنيع الحيوي	مقاربة موجهة	مسارات التصنيع الحيوي غير معروفة جيداً، ليس من جينات مكلونة

5.4.23 الهندسة الأيضية أو هندسة الأيض Metabolic engineering

بوجود وسائل علم الأحياء الجزيئي المتوفرة حالياً، تبرز دائماً إمكانيات جديدة لتحسين إنتاجية مصنع الخلية النباتية لمركبات معروفة أو حتى لإنتاج مركبات جديدة كلياً. لكنَّ هذا، يتطلب معرفة عميقة في مسار أومسارات تصنيع المستقلبات الثانوية، بما فيها تثبيت المعرفة بالمركبات الوسيطة ضمن المسار، بالإضافة إلى الأنزيمات المشاركة والجينات التي تُشفِر لها. مما يسمح للباحث المتفاني أن يطور استراتيجية لزيادة تدفق الكربون باتجاه إنتاج المنتج ذي الأهمية مباشرة. إلا أنه ولسوء الحظ، فإن المعرفة المتوفرة حول معظم هذه المسارات هي محدودة.

وضع خرائط مسارات التصنيع الحيوي

Biosynthetic pathway mapping

إن معظم مسارات المنتجات النباتية هي غالباً مبنية فقط على أساس نظريات. وبالرغم من كونها نظريات منطقية، إلا أنها غالباً ما تفتقد إلى البرهان المتين حول انخراط كافة المركبات الوسيطة المقترحة في مسار التصنيع. وهذا يعيق متابعة الدراسات حول الأنزيمات المقترح انخراطها والجينات التي تُشفِر لها. نتيجةً لذلك، هناك حاجة إلى وضع خرائط شاملة للمسارات. بشكل أساسي، يمكن استخدام مقاربتين، أحدها تبدأ من جهة المستقلب، وآخرى من جهة الجين.

بالنسبة إلى المقاربة الأولى، يتم تزويد النبتة أو المزارع الخلوية النباتية بالمركب الوسيط المزعوم إضافةً إلى تنفيذ تفاعلات أنزيمية في الزجاج للتأكد من دورها في المسار الحيوي. يتبع ذلك عزل وتنقية الأنزيم عند كل خطوة على انفراد، الذي يمكِّن لاحقاً من استخدام المعلومات حول تسلسل الأحماض الأمينية المكتسبة من الأنزيم في كلونة الجين. ولإثبات انخراط المركبات الوسيطة في التفاعل، تَستخدِم مقاربةٌ جديدةٌ مُركباتٍ سالفةً، كالغلوكوز الموسوم بالكربون 13، ثم يليها تحليل الناتج النهائي باستخدام الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 (C13- NMR)وذلك من أجل إظهار، في أي موضع أو مواضع، تمّت إضافة

الكربون 13 على الجزيء المُولى الأهمية. وبناء على هذه المعلومات، يمكن اقتراح المسار الممكن، كما يمكن التنبؤ بالمركبات الوسيطة المحتمل انخراطها في المسار. لقد أظهرت هذه المقاربة التي تدعى مقاربة التصنيع الحيوي التراجعي نجاحها الكبير في وضع خريطة لمسارات حيوية معقدة.

أما فيما يتعلق بالمقاربة المبنية على أساس الجين، فتُستخدم استراتيجيات مختلفة. إحدى هذه الاستراتيجيات المعروفة بشكلٍ جيد هي استراتيجية إحداث الطفرات. فبدلاً من الإنتاج العشوائي للطفرات (مثلاً بواسطة الإشعاع أو الكيمياويات المطفرة)، فإن أدوات علم الأحياء الجزيئي متوفرة في أيامنا هذه من أجل تعطيل الجينات بطريقة أكثر انتقائية (مثلاً، وسم العامل الجيني المتنقل (Transposon tagging)، أو استخدام جينات مضادة للتعبير Antisense genes) أو الــ RNA المتدخِّل (RNAi)، انظر الفصل الخامس). تتطلب مقاربات التطفير وتعطيل الجين تحليل المستقلبات في النبتة من أجل تحديد الخطوة أو الخطوات التي تأثرت، في المسار الحيوي. وفي حال كون المركبات الوسيطة غير معروفة، ستكون هذه المقاربة صعبة التنفيذ. في الوقت الحالي، لا تزال المقاربة الكلاسيكية المتمثلة بتعريف كل خطوة على انفراد من مسار التصنيع الحيوي، وبالتالي، عزل الأنزيمات وكلونة الجينات المُشفرة هي الطريقة المؤكدة لحل مسار التصنيع الحيوي.

التقنيات من أجل تحوير النبات Techniques for plant transformation

هناك طريقتان هما الأكثر شيوعاً لإدخال جينات جديدة داخل النبات: نقل الجينات بواسطة بكتيريا الأَجْرَعية Agrobacterium ونقل الجينات المباشر بواسطة قصف الجُسيم(Direct gene transfer by particle bombardment).

الأجرعية المورِمَة Agrobacterium tumefacien هي بكتيريا سالبة الغرام تقطن في التربة، وتسبب مرض التدرّن التاجي (Crown gall) للنبات. تصيب هذه البكتيريا النباتات في أماكن الجروح، ثم بعد إحداث الإصابة تقوم بنقل بعض الجينات من البلازميد المحفز للورم Tumer-inducing (Ti) plasmid إلى جينوم خلايا

النبات، مسبّبة زيادة في إنتاج *الأكسينات (Auxins) والسيتوكينينات (Cytokinins)* . وهذا يجعل الخلايا تتكاثر بسرعة، مما يؤدي إلى تشكل التدرن. لقد جرى تعديل هذا النظام الطبيعي للتحوير عن طريق استبدال الجينات المحفزة للورم بجينات أخرى يتم ادخالها في خلايا النباتات التي ستستخدم في الزراعة المخبرية.

يستخدم حالياً نظام ناقل *الأجْرَعِية الموْرِمة* الثنائي بشكل واسع في تحوير الخلايا النباتية المعزولة. في هذا النظام، تستخدم سلالة من بكتيريا *الأجْرَعِية الموْرِمة* التي تحتوي على بلازميدين؛ **أحدها** هو بلازميد ناقل، يحتوي على جينات غير مكونة للورم (Non-oncogenic) (غير مكونة للسرطان) تدعى T-DNA، والجينات الغريبة المتوخى إدخالها إلى النبتة للتعبير عنها، بالإضافة إلى جينات الانتقاء والإخبار المناسبة، و**الثاني** هو، البلازميد "المساعد" الذي يأوي جينات خبيثة تؤثر في انتقال الجينات غير المكونة للورم T-DNA. لسوء الحظ، إن معظم النباتات وحيدة الفلقة (مثل الحبوب والأعشاب بما فيها الأرز والذرة) غير مطواعة للتحوير بواسطة بكتيريا *الأجْرَعِية*. يتسبب نوع بكتيريي قريب، وهو بكتيريا *الأجرعية* من النوع *رايزوجين (Rhizogenes)* ، بنمو ورمي في الجذور المسمّاة بـــــ *"الجذور الشعرية" (Hairy roots)* . الذي يُستخدم لتحفيز تشكل مزارع الجذور الشعرية من أجل إنتاج المستقلبات الثانوية.

يمكن تحقيق النقل المباشر للجينات إلى جميع البناتات وذلك، حرفياً عن طريق إطلاق جسيمات صغيرة من التنغستين أو الذهب (بقطر من 0.4– 1.2µm ميكروميتر) مغلفة بالــ DNA بغية إيصالها إلى داخل خلايا النبتة (مثلاً في ورقة نباتية أو معلق خلوي نباتي). إن مقرابة مدفع الجسيمات هذا (أو القصف بمقذوفات دقيقة أو ما يسمى بالمقذوفات الحيوية) هي مستخدمةٌ بشكل واسع في هذه الأيام.

بغضّ النظر عن الوسيلة المستخدمة في إدخال الــ DNA الغريب إلى داخل الخلية النباتية، تحتوي قطعة الـــ DNA المراد إدخالها، بالإضافة إلى الجين المرغوب، على جين واسم قابل للانتقاء وعلى المحضِّض المناسب (انظر الفصل الرابع). يضفي جين واسم الانتقاء هذا صفة المقاومة ضد مركب سامّ: عادة ما تكون مقاوَمةً ضد مضاد حيوي في حالة الخلايا النباتية، كالكنامايسين (Kanamycin)

والهايغرومايسين (Hygromycin)، أو مبيد عشبي، كالغلايفوسات (Glyphosate). وبذلك عندما تُنَمَّى الخلايا على وسط يحتوي مركبٍ مثل هذه المركبات السامة، فإن الخلايا التي تسلّمت الجين المنقول، الذي يُشفِر للمقاومة ضد المركب السام، وضمّنته في جينومها، هي التي ستتمكن من البقاء في الوسط بوجود المركب السامّ، أما الخلايا التي لا تعبّر عن *الجين المقاومِ* فستموت. وبالنسبة إلى المحضض فهناك حاجة إليه من أجل تحقيق تعبير بنيوي أو موضعي عن الجينات المرغوبة في الخلايا النباتية. يستخدم محضّض فيروس موزاييك القرنبيط S35 (CaMV 35S) بشكل واسع في التعبير البنيوي داخل أجزاء النبات كافة. تتوفر أشكال متنوعة من المحضضات البنيوية، والمتخصصة بالنسيج والقابلة للتحفيز (مثلاً بواسطة الأشعة ما فوق البنفسجية، المركبات القشرانية السكرية Glucocorticoids أو التتراسيكلين Tetracycline) وذلك من أجل تعبير أكثر تخصصاً (نوعية) عن جينات في النبتة ككل أو في أنسجتها.

ومن أجل تأكيد حدوث التحوير على الخلايا، يتم إيضاً إدخال *جينات مُخبِرة* مع الـــ DNA الذي يتم نقله داخل الخلايا النباتية مثل جين GUS الذي يُشفِر لأنزيم بيتا-غلوكورونيداز، والجينات التي تُشفر لبروتينات متفلورة كالبروتين ذي الفلورة الخضراء Green fluorescent protein (GFP) . تمكن البروتينات المتفلورة من التأكد مباشرة من وجود الخلايا المحورة باستخدام المجهر، وهذا يعني عدم الحاجة إلى قتل الخلايا، كما يحدث عند استخدام تفاعل التلوين بواسطة جين GUS.

بشكل عام، يمكن لأي نوع نباتي أن يُحوَّر وراثياً. إلا أن المشكلة في ذلك هي معدلات التحوير المنخفضة، أي أن عدداً قليلاً من الخلايا تتلقى الجينات المرغوبة. كما أنه حتى عندما يتم إدخال (تلقي) الـــ DNA فقد لا تُنتج البروتينات الفعالة التي تُشفر لها. فقد يؤثر التعبير المفرط عن جين طبيعي في النبات بصورة عكسية في عملية التحوير، وذلك بإسكات الجين gene silencing. وهكذا إن المشكلة الرئيسية هي في توليد نباتات من الخلايا المحورة سليمة وقابلة للنمو.

أهداف الهندسة الأيضية Targets for metabolic engineering

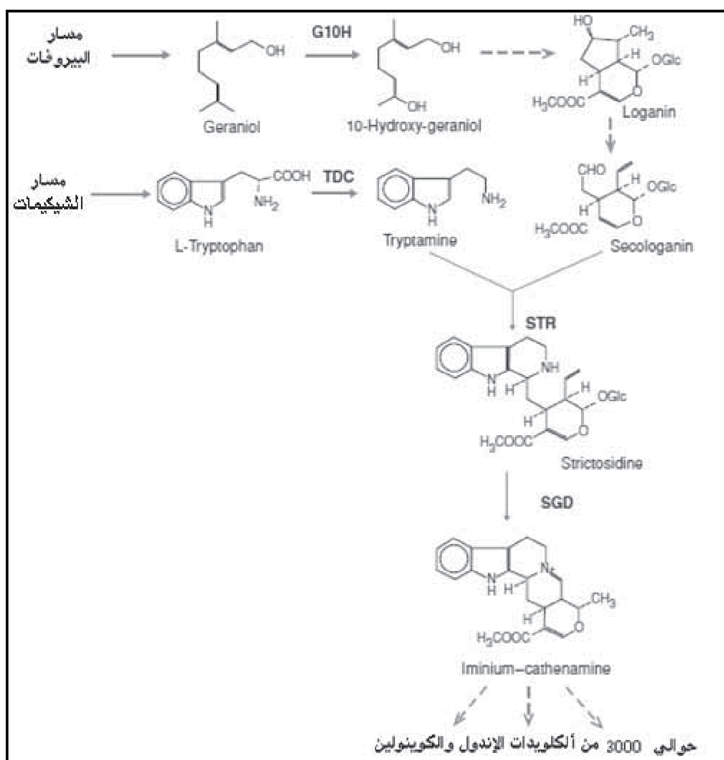
للمرء أن يتصور أهدافاً كثيرة للهندسة الأيضية، التي يمكن أن تضم:

- تحسين إنتاج المركب أو البروتين المنشود من أجل عمليات الاستخلاص والعزل اللاحقة؛
- تحسين المقاومة ضد الحشرات المؤذية والأمراض؛
- تخفيض مستوى المركبات غير المرغوبة في نباتات الطعام؛
- زيادة نسبة المركبات المرغوبة في الطعام (مثل الفيتامينات)؛
- إعطاء ميزات جديدة (لون، طعم، رائحة) إلى الطعام، أو الورود أو نباتات الزينة.

هناك عدة توجهات من أجل تحسين إنتاجية مزارع النباتات أو الخلايا النباتية، وتشمل: الإفراط في تعبير الجينات التي تُشفر عن الأنزيمات المُحَدِّدة لسرعة التفاعلات؛ أو قطع المسارات المنافسة أو قطع المسارات الهدمية للمنتج ذي الأهمية. في التوجه الأول، من المطلوب وجود جينات تؤدي إلى تعبيرٍ مفرط عن أزيمات فعّالة. بينما التوجهان الآخران، يمكن تحقيقهما من خلال إدخال جينات مضادة أو استخدام RNAi. وفي الحالتين، يتم تعطيل خطوة في المسار على مستوى الـــ RNA الرسول عن طريق التفاعل المتبادل بين الـــ RNA المنقول والـــ RNA الطبيعي الموجود في الخلية، مما يؤدي إلى إخفاض فعالية الأنزيم المُشفَر إليه.

يمثل تحسين عملية إنتاج الكلويدات إندول التربنويد Terpenoid indol alkaloids في خلايا نبتة *الكاثرانثاس روسوس Catharanthus roseus* مثالاً على الهندسة الأيضية. إذ تشكل هذه النبتة مصدراً مهماً للمركبات الدوائية مثل الأجماليسين (Ajmalicine) (المُستخرج من الجذور)، والفينبلاستين (Vinblastine).

والفينكريستين Vincristine (المستخرجان من الأوراق)، التي تشتق جميعها من المركبات السالفة، التريبتوفان Tryptophan والجيرانيول Geraniol (انظر الشكل 2.23). لقد تم كلونة عدة جينات من مسار الاشتقاق هذا في المزارع الخلوية للنبتة المذكورة، وتبيّن أن التعبير المفرط للجين الذي يُشفر إلى ديكربوكسيلاز التريبتوفان (Tryptophan decarboxylase) (TDC) ينتهي إلى إنتاج أعلى للتريبتامين (Tryptamine) فقط، مما يُدل على أن توفر السيكولوجينين (Secologanin) هو العامل المقيِّد لتصنيع الألكلويدات الحيوي. إلا أنه، ومن غير المتوقع أن التعبير المفرط لمُصنّع الستريكتوزيدين (Strectosidine synthase) (STR) ينتهي إلى إنتاج أعلى للألكلويدات.



الشكل 2.23: الخطوات المبكرة في التصنيع الحيوي لألكلويدات إندول التيربينويد (جيرانويل 10- هيدروكسيلاز, geraniol-10 hydroxylase, G10H؛ تريبتوفان ديكاربوكسيلاز، tryptophan decarboxylase, TDC؛ ستريكتوديسين سينثاز، STR strictosidine synthase,؛ ستريكتوزيدين غلوكوزسداز، SGD, glucosidase strictosidine).

بشكلٍ عام، تبين دراسات الهندسة الأيضية باستخدام جين بنيوية واحدة مأخوذة من مسار أيضي نباتي، أن زيادة إنتاج المركب المرغوب ليست بكبيرة جداً. وهذا يعود إلى جملةٍ من الأسباب تتمثل في إمكانية حصول عدة خطوات مُقيِّدة خلال المسار أو في المواصلات داخل الخلية أو بين الخلايا، وهذا مما يمكن أن يلعب دوراً هاماً في حجم الإنتاج. ولتجاوز هذه المشاكل، فإن الجينات التنظيمية التي تتحكم بتعبير جميع أو معظم جينات هذا المسار، هي ذات أهمية كبيرة. إذ إن التعبير المفرط لمثل هذه الجينات قد يؤدي إلى زيادةٍ دائمة في سلسلةٍ من أنزيمات المسار الأيضي.

إنتاج مؤيضات ثانوية في نباتات أخرى

Production of secondary metabolites in other plants

يمكن للمرء أن يذهب إلى الإفراط في التعبير عن مركبات (قسم منها) في مسار التصنيع الحيوي لدى أنواعٍ أخرى من النباتات، بدلاً من النوع المنتِج الأصلي، من أجل الحصول على مصدرٍ أفضل لإنتاج المركب. فعلى سبيل المثال، يوجد مسار تصنيع السيكولولوغانين (Secologanin) الحيوي، المستخدم في التصنيع الحيوي لألكلويدات أندول التيربينويد، في نباتات عديدة لا تنتج الألكلويدات. وبذلك، من خلال الإفراط في تعبير الجينات *Tdc*و *Str* في مسار تصنيع الألكلويد (الشكل 2.23) في مزرعة خلايا نبتة الويغيليا *Weigelia* المسماة بـــ "ستيرياكا" “Styriaca” ، تبدأ خلايا هذه النباتات بإنتاج الكلويدات الإندول (تريبتامين Tryptamine)، واجماليسين (Ajmalicine) وسيربينتين (Serpentine)؛ الشكل 2.23).

إنتاج البروتينات **production of proteins**

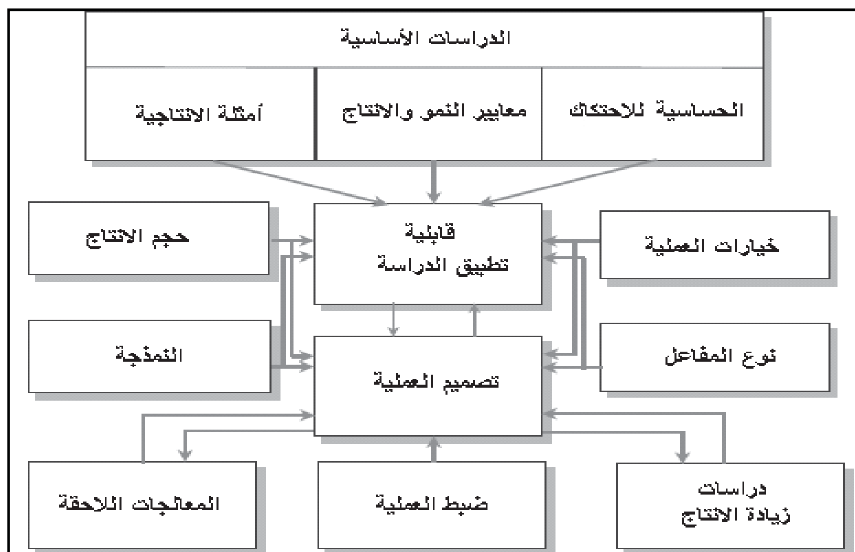
من حيث المبدأ، يمكن لأي بروتين أن يُعبَّر عنه بإفراط في مزارع النباتات أو الخلايا النباتية. وبما أن النباتات رخيصة، فقد زاد هذا من الاهتمام في استخدام النباتات لإنتاج أشكال متنوعة من البروتينات الدوائية، واللقاحات والأجسام المضادة. وقد أعطتها مقدرتها الحقيقية في إضافة مجموعة الغلايكوزيل على البروتينات ميزة إضافية لاستخدام بعض خطوط الخلايا النباتية لإنتاج بروتينات

مثل الإنسولين وألبومين المصل لدى الانسان Human serum albumin (HSA). إلا أن النباتات والخلايا النباتية غير معترف بأمانهم بشكلٍ عام (GRAS) من أجل استخدامهم في إنتاج بروتينات علاجية. إذ يُعتبر تسجيل منتج من كائنات غير معترف بأمانها بشكلٍ عام non-GRAS كدواء، مسعىً أساسياً يتطلب دراسات أمان موسعة. وهذا مُكلف أكثر بكثير ممّا تتطلب مزارع النباتات أو الخلايا النباتية من تطويرٍ للإفراط في التعبير عن البروتين. وبذلك يمكن توقع إنتاج على مستوى تجاري لمنتجات نباتية ذات استعمالات غير طبية، في المستقبل القريب. أما في الاستعمالات الأخرى فإن ذلك يتطلب أولاً الاعتراف بأمانيتها.

5.23 الإنتاج على مستوى كبير Large scale production

1.5.23 المقدمة Introduction

إن الهدف النهائي من التقانة الحيوية للخلية النباتية هو تطوير عمليات ضخمة لإنتاج مستقلبات ثانوية ذات أهمية تجارية. وهذا التطوير يتضمن العديد من الخطوات المتداخلة، كما هو مبين في المخطط 1 (الشكل 3.23). في الفقرات التالية سوف تتم مناقشة هذه الخطوات المتنوعة بمزيدٍ من التفصيل.



الشكل 3.23: المخطط 1: خطوات متداخلة في تطوير عملية تقانية حيوية.

2.5.23 خيارات العملية Process options

هناك ثلاث نقاط هامة جداً يجب أخذها بعين الاعتبار لاختيار نوع العملية خلال تصميم عملية الإنتاج المستخدم فيها خلايا أو أنسجة نباتية، وهي: نوع المزرعة (مزرعة خلايا حرة، أو مزرعة خلايا مقيدة الحركة أو مزارع أعضاء)، وتمركز المنتج (داخل الخلية أم يُطلق خارجها) ومدة الإنتاج (خلال طور النمو أم خلال طور السكون). أما من ناحية الإنتاج، فهناك أنظمة مختلفة يمكن اعتبارها:

- مزارع المعلقات الخلوية،
- خلايا مقيدة الحركة،
  - تقيد الحركة على السطح (أغشية حيوية)،
  - خلايا مُلتقطة بالهُلام،
- مزارع الأعضاء،
  - الجذور،
  - الفروع،
  - الجذور الشعرية.

إن انفصال وقت طور النمو عن وقت طور الإنتاج هو خاصية العديد من المزارع الخلوية النباتية. لذلك يتطلب هذا عمليات ذات مرحلتين يتم فيها أمثلة شروط النمو والإنتاج بشكلٍ منفصل.

يمكن أن تُنفَّذ عمليات التخمير كعملية الدفعة الواحدة أو الدفعة المغذاة أو المستمرة (انظر الفصل السادس)، لكنه من المفضل عادةً استخدام عمليتي الدفعة الواحدة والدفعة المغذاة في تقانة الخلية النباتية الحيوية. إذ يقدم نظام مزرعة الدفعة المغذاة ميزة تغيير شروط المزرعة في المفاعل بشكلٍ تدريجي من وسط النمو إلى وسط الإنتاج من غير أن يكون هناك طور انتقال حاد. كما يتسبب وجوب تلقيح المزارع الخلوية النباتية بكميات كبيرة نسبياً من الكتلة الحيوية للحصول على مزارع سريعة النمو (10−20% من تركيز الكتلة الحيوية النهائية)، بالحاجة إلى عملية تخمير متسلسلة وطويلة، ابتداءاً من مزرعة المختبر التي يتم زيادة حجمها

تدريجياً بعامل 5–10 بين المخمر والآخر الذي يليه. لذلك في هذه الحالة، عند استخدام عملية الدفعة المغذاة فإن قافلة المخمرات يمكنها أن تصبح أقصر (خطوات الأحجام المستخدمة تصبح 1، 15، 30)، لأن المخمر الأكبر التالي يكون محتوياً على حجم ملقح ووسط نقي بما يعادل حوالى 30% من حجمه، وبذلك عند بدء النمو سيزداد هذا الحجم تدريجياً حتى امتلاء المخمر والوصول إلى حجم زرع بنسبة 100% من حجم المخمر.

تمتلك مزارع المعلقات الخلوية النباتية بعض الخصائص التي تجعل عملية تطبيق نظام المزرعة المستمرة أمراً معقداً. فمعدل النمو النوعي المنخفض لديها يتطلب وقتاً طويلاً للوصول إلى حالة الاستقرار، وبذلك يجب إبقاء المزرعة لعدة أشهر إذا كانت اقتصاديات هذه التقنية متوفرة. إلا أن خطورة وقوع كارثة ما (تلوُّث، تعطّل المعدّات) أثناء فترة عملية الزرع المطوّلة هذه أمرٌ جديرٌ بالاعتبار، لذلك تلقى هذه العملية معارضة من قِبل الشركات للانتفاع بها، أو اعتبارها وسيلة نافذة في تحقيق الإنتاج.

3.5.23 المفاعلات الحيوية Bioreactors

خلايا النباتات وإجهادات قوة الموائع

Plant cells and hydrodynamic stress

عندما تقارن الخلايا النباتية بالكائنات المجهرية، فإن الخلايا النباتية هي أكبر بكثير. يعود ذلك بشكلٍ رئيسي إلى الحُويصلات الكبيرة الموجودة فيها، التي يمكن أن تشكل حتى 95 % من حجم الخلية الكلي. في البداية كان من المعتقد أن تحريك الخلايا النباتية، التي هي في جوهرها مثل كيس من الماء لدقة جدارها الخلوي، في المفاعل الحيوي سيؤدي إلى انخسافها بسبب جهد الاحتكاك الناتج (تأثير الاحتكاك في الكائنات المجهرية تمّت مناقشته في الفصل السابع). فكان الرأي المتداول أن المفاعل الحيوي ذا المصعد الهوائي (انظر الفصل السابع) هو

النوع المفضّل من المفاعلات، لكن مفاعلات حيوية أخرى أيضاً تم تصميمها بشكلٍ خاص لتكون منخفضة الاحتكاك من أجل تجنب تعريض الخلايا النباتية إلى جهود الاحتكاك العالية. ولكن خلافاً لهذا كله، أظهرت الأبحاث الحديثة أن معظم المزارع الخلوية النباتية هي قوية بشكلٍ كافٍ لتتم زراعتها في المفاعلات الحيوية التقليدية المزودة بخلاطات. وقد جرى تأكيد هذا من خلال الإنتاج التجاري للمنتجات النباتية باستخدام هذا النوع من المفاعلات الحيوية.

مفاعلات حيوية من أجل المعلقات الخلوية

Bioreactors for cell suspension

يمكن للخلايا النباتية والتكتلات (التجمعات) الصغيرة أن تتم زراعتها بنجاح في كلٍّ من مفاعلات الأحواض المخفوقة، والمفاعلات ذات نظام المصعد الهوائي، وتلك المهواة بأعمدة فقاعات، إضافة إلى مفاعلات القعر المسيل (للتفاصيل انظر الفصل السابع). والمفضل من بين هذه الأنظمة هي أنظمة مفاعلات الأحواض المخفوقة، وذلك لعدة أسباب. فهذه المفاعلات تُعتبر الجهاز المقياس في صناعة التخمير، كما يمكنها أن تحمل أعلى التراكيز من الخلايا النباتية، وأن تُبقي على مواصفات جيدة من الامتزاج وانتقال الأكسجين في المزرعة الخلوية النباتية.

إن معظم المعرفة المتوفرة عن الكائنات المجهرية هي قابلة للتطبيق على خلايا النباتات. غير أن هناك بعض الفروقات التي لا يمكن تجاهلها (انظر الجدول 4.23).

تسلك المعلقات الخلوية النباتية لدى تراكيز منخفضة مسلك السوائل النيتونية؛ لكنها لدى تراكيز مرتفعة فغالباً ما تصبح سوائل مطاوعة (Pseudoplastic). وهذا بإمكانه أن يؤدي إلى تشكيل رزم من الكتلات الحيوية بعيداً عن الخلاط، فتصبح بعد ذلك غير ممزوجة بشكلً جيد وتعاني أيضاً انعدام الأكسجين. لقد تم القيام بعدة دراسات من أجل تنفيذ تصاميم لخلاط بديل (منخفض الاحتكاك، ويمتلك صفات المزج الجيد للسوائل الشبيهة بالبلاستيك، وبإمكانه إجلاء

الفقاقيع بشكلٍ مناسب وقليل تشكل الرغوة) يُستخدم في مزارع خلايا النباتات. فكان المفاعل الحيوي المزود بتوربينة ذات الانسياب المحوري والضخ الموجه إلى أعلى، هو الذي قدم ميزات هامة للإبقاء على الهواء والمزج بقوة مقيدة من أجل اجتناب مشاكل الاحتكاك.

مفاعلات حيوية من أجل أنظمة مقيَّدة الحركة إصطناعية

Bioreactors for artificially immobilised systems

يمكن تحفيز إنتاج خلايا النباتات من خلال تقييد حركتها لأن ذلك يؤمن حمايتها ضد إجهاد قوة السوائل والتماس الخلوي. إضافةً إلى سهولة فصلها من الوسط، وإمكانية إعادة استعمال الكتلة الحيوية وتنفيذ تخفيفات بمعدلات عالية من غير إزالة للكتلة الحيوية.

يمكن أن تكون المفاعلات الحيوية المستخدمة في تنمية النباتات والمطمورة في حباب هلامي أو مكعبات رغوة، إما أوعية مخفوقة أو أعمدة مرصوصة، أو مفاعلات ذات مصعد هوائي أو قعر مسيّل. إلا أنه وبسبب تأمينها تبادل الغاز الأمثل، فإن المفاعلات الحيوية ذات الأوعية المخفوقة هي الاختيار الأول.

مفاعلات حيوية من أجل أنظمة مقيَّدة الحركة طبيعية

Bioreactors for natural immobilized systems

تختلف أنظمة مزارع الأعضاء عن الأنظمة المقيَّدة الحركة الأخرى بكونها مكونة من بنيات منظمة جداً، ولكن لدى استخدام المفاعلات الحيوية المخفوقة فإنها تكون نسبياً عرضةً للتحطم.

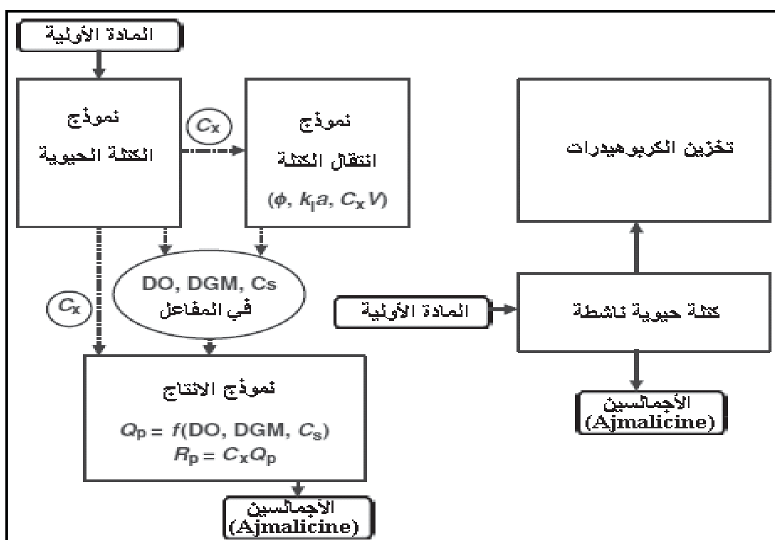
إن معظم البحث الذي تم القيام به كان على مزارع الجذور المحورة. وبالرغم من أن الخلايا في هذه *الجذور الشعرية* هي محمية من إجهاد الاحتكاك، إلا أن الجذور نفسها عُرضةً للتحطم بواسطة الخلاط، ما يؤدي إلى تطور أنسجة

شبيهة بالجُسْأة غير متمايزة. إن المشكلة الخاصة بالجذور الشعرية هي حاجتها إلى أن تتعلّق بنقطة ثابتة لتنمو بشكلٍ جيد. لذلك من أجل الاستخدام الأمثل للمفاعلات الحيوية الكبيرة، فإنه من الضروري توفر العديد من نقاط التعليق هذه. أما عملية التلقيح فتحتاج إلى تصميمٍ خاص لتحقيق انتقال الجذور من وعاء إلى الذي يليه، حيث إنه بعد تعلقها يمكن للجذور أن تبدأ بالنمو لتشكل تجمعات كثيفة.

لقد تم تحقيق إمكانية نمو الجذور الشعرية في بيئة رطبة عن طريق استخدام مفاعلات ضبابية (حجم القطرة، 0.01-10 μm)، أو بخاخة (حجم القطرة، 10– 100μm)، أو بالتنقيط (حجم القطرة، 1-5mm). تقدم الأنظمة الضبابية والبخاخة ميزات أفضل لتبادل الغاز بين الخلايا والوسط، وذلك لوجود طبقة سائلة أدق على الجذور. أما تقنية التنقيط فتقدم آفاقاً أفضل للتطوير على نطاق واسع.

لقد نُفذت دراسات أيضاً على مزرعة *الفروع* وعملية تطوير الأجنّة الناشئة من خلايا غير جنسية في المفاعلات الحيوية. هذه الفروع هي حساسة للإجهاد الفيزيائي: ففي حالة تعرضها للجَرح، يمكن أن تفرز منتجات غير مرغوبة؛ كما أن عملية تلقيح المزرعة بها هو أمرٌ صعب. تحتاج الفروع إلى الضوء من أجل التمثيل الضوئي، وهي ليست بحاجة إلى التحريك المستمر لأن معدل التبادل بين الفروع والوسط منخفض. لقد تم تحقيق تقارب ناجح لإنتاج الفروع على نطاق واسع من خلال التلقيح بخلايا بدائية (في أبكر مرحلة من تطور الورقة في الفرع الغليظ) في أوعية مخفوقة ومهواة ذات سعة 500 ليتر مع تزويدها بمصابيح فلورية من الداخل لتأمين دورة الليل والنهار.

وفي إطار تكاثر النباتات على مستوى ضخم، تعتبر عملية تطوير *أجنة ناشئة من خلايا غير جنسية* (أشكال منتظمة صغيرة من الخلايا القادرة على التطور في بذورٍ تشبه النبات) عملية أخرى جديرة بالاهتمام. تتطلب هذه العملية تغيراً سهلاً لمكونات الوسط من أجل دعم تطور الجنين، ونظام تحريك يُجتنب فيه التحطيم الناتج من الاحتكاك. لتحقيق هذه الشروط، تم اقتراح مفاعل حيوي ذي مرشحٍ دوار.



الشكل 4.23: مخطط 2: الرسم التوضيحي يساراً: مخطط تمثيلي لنموذج عملية مرحلة إنتاج الأجماليسين بواسطة *الطافر سي روسوس C. roseus*. الرسم التوضيحي يميناً: نموذج إنتاج نظامي مبسط للأجماليسين. المفتاح: *Cx*، تركيز الكتلة الحيوية؛ φ، معدل جريان (انسياب) الهواء؛ *k1a*, معامل انتقال الكتلة؛ V, حجم المفاعل؛ DO، تركيز الأكسجين المنحل؛ DGM، تركيز المستقلبات الغازية المنحلة؛ C s، تركيز المادة الأولية؛ *Qp*، معدل إنتاج الأجمليسين النوعي؛ *Rp*، معدل إنتاج الجماليسين الحجمي.

4.5.23 النمذجة الرياضية Mathematical modeling

لقد تمّت مناقشة المظاهر العامة في إعداد نماذج عيانية لعمليات التخمير في الفصل الثالث والسادس. وبالنسبة إلى خلايا النباتات هنا، فيمكن أيضاً تطبيق نفس التوجه. إذ يوجد فقط بعض الخصائص المحددة المتعلقة بنمو أو إنتاج الخلايا النباتية التي يجب أن تُؤخذ بالحسبان، وذلك لإمكانية تسببها في بعض المضاعفات. تتغير مكونات خلايا النباتات إلى حدٍّ بعيد خلال نمو الدفعة، وذلك لأنها تمتلك القدرة على تخزين المصدر الكربوني كمنتجات نشوية، حيث إنها تقوم باستهلاك هذه المنتجات عند نفاد المصدر الكربوني في الخارج.

في معظم استعمالات المزرعة الخلوية النباتية يجب أن يتم وصف كلٍّ من عمليات النمو والإنتاج في نماذج نظامية بحيث تُقسم الكتلة الحيوية إلى حيزين:

حيز الكتلة الحيوية الناشطة (الذي يتم فيه عمليات التحول الكيميائية الحيوية) وحيز التخزين (الذي يحتوي على المنتجات النشوية).

في العديد من الحالات، تظهر عمليات التخمير بالدفعة الواحدة على مرحلتين، وذلك لتشغيل العملية بالشكل الأمثل وإنتاج المستقلبات الثانوية. تتطلب سائر المراحل من النمو والإنتاج النماذج الخاصة بها (انظر المخطط 2، الشكل 4.23، كمثال لنموذج نظامي).

أما في نمذجة مزارع الجذور الشعرية رياضياً، فإن الوضع يختلف تماماً. في هذه الجذور هناك ثلاثة أنواع من الخلايا: خلايا تنقسم عند طرف الجذر، وخلايا في حالة التمدد الخلوي، وخلايا متمايزة لا تنقسم. جميع هذه الخلايا تمتلك مواصفات نمو نموذجية ويجب التعامل معها كمجتمع خلوي مختلف، مقترنةً بمعادلات معدل انتقال الخلايا من مجتمعٍ خلوي إلى آخر. وبذلك ينتهي هذا إلى نموذج متجزئ بدلاً من نموذجٍ متواصل، كما هو مُطبّق عادةً في مزارع الجراثيم والخلايا النباتية المعلقة.

الجدول 10.23: أمثلة على النِسب المئوية للأكسيجين وثاني أكسيد الكربون في الطور الغازي لكلٍّ من المفاعل الحيوي الممزوج والمهوأ جيداً، والدورق الهزاز

	المفاعل الحيوي		الدورق الهزاز	
	O_2 (حجم/حجم%)	CO_2 (حجم/حجم%)	O_2 (حجم/حجم%)	CO_2 (حجم/حجم%)
بعد التلقيح	21	0.03	21	0.03
عند نهاية طور النمو التصاعدي	20.3	0.7	13	11

5.5.23 ضبط العملية Process control

يتبع ضبط العملية في الإنتاج الخلوي لدى النباتات المبادئ العامة التي تم وصفها في الفصل العاشر.

بالطبع، من الضروري اكتشاف أي معيار يجب أمثلته وأي معيار هو الحاسم. فلتحقيق إنتاجية قصوى في المرحلة الأولى من العملية ذات المرحلتين، يكون تركيز الكتلة الحيوية هو المعيار المستهدف. أما المعيار الحاسم فهو انتقال الأكسجين. إن الامكانيات التي تزيد من انتقال الأكسجين إلى حدٍّ أعلى، هي: التحريك الشديد، ومعدل ضخّ الهواء المرتفع أو التهوية بغاز مخصّب بالأكسجين. إلا أنه يجب الانتباه خلال ضبط العملية، إلى سرعة التحريك القصوى المقبولة، وإلى معدل ضخ الهواء والتركيز الأقصى للأكسجين المسموح به في الغاز أثناء التهوية.

والأصعب من ذلك هو تحديد المعيار الحاسم خلال مرحلة إنتاج المركب المنشود. فهناك العديد من العوامل التي تلعب دوراً في عملية تحفيز الإنتاج، كتراكيز الأكسجين وثاني أوكسيد الكربون؛ وتركيز مركبات أخرى، في بعض الأحيان غير معروفة، من المستقلبات الغازية؛ وتركيز الغلوكوز؛ وتركيز هورمونات ومحرضات نباتية.

6.5.23 زيادة الإنتاج Scale – up

من وجهة نظرٍ تقنية، إن نظام الخلية المعلقة في المفاعل الحيوي هو نظام الإنتاج المفضل، وذلك لتجانسه نسبياً، ما يعني أنه سهل المزج والتهوية والضبط. إن "المفاعل الحيوي" المستخدم عادةً في دراسة الخلية النباتية هو الدورق الهزاز الذي يختلف عن الأوعية المخفوقة تقريباً من جميع النواحي: كالشكل الهندسي، والمزج والتهوية، مما يؤدي إلى إحداث فروقات كبيرة في شروط النمو وتشكيل المنتج. إضافةً إلى ذلك، يختلف الدورق الهزاز عن الأوعية المخفوقة بصورةٍ خاصة في مكونات الطور الغازي (الجدول 10.23)، في حين أن هذه المكونات تتأثر أيضاً وبشكلٍ كبير، في حالة الدورق الهزاز، بنوع أداة الاغلاق المستخدمة فيه. لذلك يجب إنجاز تجارب نظام إنتاج الخلية النباتية مخبرياً في أبكر وقتٍ ممكن، وذلك على نطاقٍ مصغّر باستخدام النوع المناسب من المفاعلات للإنتاج التجاري.

ليس هناك من إرشادات مباشرة لحل مشكلة زيادة الإنتاج، وذلك لتضمُّنها آلياتٍ شتى متداخلة؛ على سبيل المثال، إن سرعة التحريك ستزيد من معدل انتقال

الهواء، لكنها يمكن أن يكون لديها تأثير احتكاك سلبي على الخلايا النباتية. لذلك لا بدَّ من القيام بالتسويات. يلخص الجدول 11.23 مقارباتٍ مختلفة لحل هذه المشاكل.

الجدول 11.23: طرائق زيادة الإنتاج
1. المحاولة والخطأ
2. قواعد التقليب
3. مقاربة تخفيض الإنتاج/ تحليل النظام
4. تحليل الأبعاد/ تحليل النظام
5. الطرائق شبه الأساسية
6. الطرائق الأساسية

إن الهدف من منهجية زيادة الإنتاج هو اجتناب مبدأ المحاولة والخطأ، لأن ذلك يستلزم بقاء الحاجة إليه في العمليات ذات المستوى الضخم، وهذا باهظ الكلفة جداً. تعتمد طرائق 4، و5 و6 في الجدول 11.23 على امتلاك مقدار من المعلومات عن الآلية المستخدمة أكثر ممّا هو متوفر عنها حالياً في معظم عمليات التقانة الحيوية النباتية. لذلك من الأكثر ملاءمةً الجمع بين قواعد التقليب وتحليل النظام مع تخفيض الإنتاج. إن مقاربة تحليل النظام مع تخفيض الإنتاج تعني تحديد الآلية المقيِّدة للسرعة على المستوى الضخم، وذلك على أرضية نظرية، أو من خلال تجربةٍ في العملية القائمة.

هذه الخطوة المقيّدة للسرعة يمكن دراستها بالتفصيل في عملية الإعداد على مستوى مصغر. فمثل هذه الدراسة تمكننا من تطوير تحسينات على المستوى الضخم.

7.5.23 جدوى تطبيق الدراسة Feasibility

تهدف التقانة الحيوية للخلية النباتية إلى الإنتاج التجاري لمستقلبات ثانوية مهمة اقتصادياً. وما نقوم به هنا هو تقييم الكِلَف لشيءٍ من الإنتاج التجاري. ففي الفصل الحادي عشر تم البحث بصورةٍ مستفيضة عن التوجه العام لدراسة قابلية تطبيق عملية التقانة الحيوية.

إن المقاربة ذات المرحلتين (النمو والإنتاج) كما هو موصوف أعلاه، هو التصميم المقترح والسائد أكثر في العملية الصناعية لتقانة النباتات الحيوية.

إلا أن مقاربة أخرى مختلفة تتضمن إعادة استخدام الكتلة الحيوية من خلال التحفيز الطبيعي أو المصطنع لإطلاق المنتج من الخلايا من الممكن تحقيقها أيضاً. فيما يلي سيتم مناقشة استراتيجيات عملية الإنتاج، التي تضم:

- عملية الدفعة، مع استخدام الكتلة الحيوية لمرة واحدة،
- العمليات المستمرة وشبه المستمرة مع،
  - استخدام متكرر للكتلة الحيوية وإطلاق المنتج تلقائياً،
  - استخدام متكرر للكتلة الحيوية ودفع إطلاق المنتج من خلال جعل الخلايا منفذة،
  - استخدام متكرر للكتلة الحيوية المقيّدة حركتها.

ومما يجب التشديد عليه هنا، أن المعالجات اللاحقة، ومعالجة مياه الفضلات والقوى العاملة غير متضمَّنة في حساب الكلفة هذا.

تقدير الكِلَفة Estimation of costs

إن المنتجات من المستقلبات الثانوية التي تم انتقاؤها كأمثلةٍ لتحديد الكلفة هم: الأجماليسين والبيربيرين

لقد كان الأجميليسين موضوعاً لعديد من دراسات قابلية التطبيق، وهناك كمية جديرة بالاعتبار من بيانات نمو مزارع نبتة *الكاثرانثاس روسوس Catharanthus roseus* الخلوية وإنتاجها للأجماليسين التي تم إصدارها.

والبيربيرين هو الهدف الثاني الذي اختير لهذا العمل، حيث تحققت إنتاجيته بصورةٍ عالية في المزارع الخلوية.

جرت تقديرات الكلفة هذه لكمية منتج تبلغ 3000 كيلوغرام خلال 300 يوم في السنة، مع تقدير نسبة 20% من المنتج الضائع خلال عمليات الاسترجاع والتنقية.

أوساط النمو والإنتاج Growth and production media

إن مجموع كلفة الوسط المقياس المكوّن من 3% (وزن/حجم) غلوكوز هو حوالى 50 € لكل متر مكعب ($50\ €\ m^{-3}$)، وعلى هذا الأساس، لدى حساب ثمن الوسط المركز في عملية الدفعة فإنه يبلغ حوالى 800 € لكل متر مكعب ($800\ €\ m^{-3}$). غير أن هذه البيانات يجب اعتبارها تقديرات جداً غير دقيقة، لأن أسعار المواد الكيميائية بشكلها الافرادي كثيراً ما تعتمد وبنسبةٍ كبيرة على النقاوة والكمية والمزوِّد. إضافةً إلى أن سعر السوق لأكثر مركب محدَّد للكلفة (وهو الغلوكوز) يتغير إلى حدٍّ كبير (يمثل مصدر الكربون حوالى 30% من كلفة الوسط).

في العديد من أوساط الإنتاج، يزيد فقط تركيز المصدر الكربوني مقارنة بوسط النمو؛ إذ تبلغ كلفة وسط الإنتاج الذي يحتوي على نسبة 8% غلوكوز 75 € لكل متر مكعب ($75\ €\ m^{-3}$). معظم الأوساط تحتوي على كميات متوازنة من النيترات والأمونيوم، كمصدرٍ للآزوت، وذلك من أجل توقّي تحولات غير مقبولة في الرقم الهيدروجيني. أما في المفاعلات الحيوية التي يكون فيها الرقم الهيدروجيني مضبوطاً، فإن هذا التقيُّد لا ينفَّذ، بل يبقى مصدر الآزوت مطلقاً.

تركيز الكتلة الحيوية Biomass concentration

يصل تركيز الكتلة الحيوية في الدوارق الهزازة في أغلب الأحيان ما بين 15–20 كيلوغراماً وزناً جافاً لكل متر مكعب ($15\text{-}20\ kg\ m^{-3}DW$). غير أن الكثافة الخلوية سُجّل وصولها حتى 120 كيلوغراماً لكل متر مكعب ($120\ kg\ m^{-3}$) في أنظمة تفاعل أخرى. في حين تبدأ مشاكل المزج والتهوية بالظهور لدى تراكيز كتلة حيوية أعلى من 40 كيلوغراماً لكل متر مكعب ($40\ kg\ m^{-3}$).

إنتاج الأجمالسين أو البيربيرين في المزارع الخلوية
Ajmalicin or berberine production in cell cultures

معايير الإنتاج والنمو Growth and production parameters

يُحدَّد حجم التجهيزات والسعر النهائي للمنتج بواسطة أربعة معايير مهمة للعملية: الإنتاج السنوي، ومعدل النمو النوعي الأقصى، وتشكيل المنتج النوعي

وتركيز الكتلة الحيوية الأقصى. ومن أجل تنفيذ هذه الحسابات، تم انتقاء الأجمالسين ذي الأهمية التجارية، الذي يُنتَج في مزارع نبتة *الكاثرانثاس روسوس* *Catharanthus roseus* الخلوية، والبيربيرين وهو المركب الذي سجل أعلى إنتاجية حتى الآن في مزارع نبتة *كوبتيس جوبونيكا* *Coptis japonica* الخلوية التي بلغت 7 غرامات لكل ليتر($7\ g\ l^{-1}$). كما تُعتَبر نبتة *ثاليكتروم مايَنس* *Thalictrum minus* مثالاً على المزرعة الخلوية التي تُفرز البيربيرين، مع أنها تُنتجه بمستوى متدنٍ نسبياً. لقد استُخدمت في حسابات الكلفة (جدول 12.23) معايير تم انتقاؤها من المزرعة الخلوية باستخدام مجموع الكتب المتوفرة في هذا الموضوع.

الإنتاج القائم على استخدام الكتلة الحيوية لمرة واحدة

production process based on single use of biomass

تُنمّى الكتلة الحيوية في قطار التخمير المؤلف من سلسلة مفاعلات ذات أحجام متزايدة وهي تعمل كملقحٍ من أجل مرحلة إنتاج الأجمالسين، حيث يزيد تركيز الكتلة الحيوية بشكلٍ إضافي. تبدأ عملية الإنتاج بعد أن يكون نمو المزرعة قد بدأ بالانحدار؛ في حالة نبتة *الكاثرانثاس روسوس* *C. roseus* تستغرق عملية إنتاج أقصى تركيز من الأجمالسين 21 يوماً. أما في حالة إنتاج البيربيرين، فإن مزرعة *كوبتيس جوبونيكا* *Coptis japonica* هي المفضلة، وذلك باستخدام إجراءات عملية الدفعة المغذاة. يبلغ وقت البقاء 14 يوماً، وباعتبار يوم واحد من أجل تنظيف المفاعل، وتعقيمه وإعادة ملئه، يكون قد أصبح بذلك الوقت الذي يُشغَّل فيه المفاعل 15 يوماً، وعدد مرات التشغيل هو 20 مرة في السنة.

الإنتاج في نظام استبقاء خلوي مع إطلاق المنتج تلقائياً

Production in a cell retention system with spontaneous product release

الطور الأول في هذه العملية هو قابل للمقارنة مع مرحلة الإعداد في العملية التي تُستخدم فيها الكتلة الحيوية لمرة واحدة. إذ تقوم الكتلة الحيوية من

ثاليكتروم ماينَس *Thalictrum minus* في المفاعل الأخير بتلقيح واحدٍ من مفاعلات الإنتاج الحيوية. أما في طور الإنتاج فيجري تغذية الوسط على نحوٍ متواصل، وفي نفس الوقت يتم سحب الوسط المستنفذ والكتلة الحيوية منه. بعدها يمكن استخلاص المنتج من وسط المستنفذ، إما من خلال الاستخلاص بمذيب عضوي (أو توليفة من المذيبات العضوية) أو من خلال الادمصاص باستخدام البولمر المناسب في العمود المخصص لهذه العملية. في الوتيرة شبه المستمرة، يتم جني الجزء الأكبر من الكتلة الخلوية من المفاعل فوراً لدى تولّدها مع ترك كمية كافية لتكون كملقّح للدورة التالية.

الإنتاج في نظام استبقاء خلوي مع إطلاق المنتج بجعل الخلايا منفذة

Production in a cell retention system with product release by permeabilisation

على العكس من *ثاليكتروم ماينَس* *Th. minus* التي تقوم بإفراز البيربيرين، فإن إطلاق الأجمالسين من *الكاثرانثاس روسوس* *C. roseus* قد يحتاج إلى دفعه بجعل الخلية النباتية منفذة له، وذلك باستخدام ثنائي ميثيل السلفوكسيد Dimethylsuphoxide (DMSO).

الطور الأول في العملية هو نفسه كما في عملية إطلاق المنتج بشكلٍ تلقائي. والطور الأخير هو الذي تُجعل فيه الخلية منفذة. يُسمح للخلية النباتية في هذا النظام بأن تستقر لمدة ساعتين، بعدها يتم سحب نصف الوسط ويُستبدل بـــ 10% (حجم/حجم) DMSO الموجود في الماء، مما يُفضي إلى نسبة حجم من الـــ DMSO في الوسط موازية لـــ 5%. وبعد تحريكٍ لمدة 20 دقيقة يُفترض إتمام إطلاق الأجمالسين، حيث يُتاح للكتلة الحيوية أن تستقر، ثم يُقام بسحب نصف الوسط واستبداله بـــ 8% (وزن/حجم) من محلول الغلوكوز. ومن أجل إزالة الأجمالسين كاملاً، فإنه يجب تكرار عملية الغسيل هذه ثلاث مرات، ثم يليها تلقيم مخمر الإنتاج بوسط إنتاج جديد، وعندئذٍ يمكن لجميع الإجراءات أن تبدأ من جديد. تُقدّر إمكانية المرات التي يتم فيها جعل الخلايا النباتية منفذة، وبعد ذلك إعادة تدويرها بست مرات.

الجدول 12.23: معايير العملية المستخدمة في حسابات الكلفة

نوع العملية	تصميم المعايير	كلفة الإنتاج € لكل كيلوغرام ($€\ kg^{-1}$)
الأجمالسين Ajmalicine		
استخدام الكتلة الحيوية لمرة واحدة (Single use of biomass)	**إنتاجية:** 9 غرام لكل كيلوغرام وزناً جافاً فترة الإنتاج = 21 يوم **الوزن الجاف النهائي:** 40 كيلوغرام لكل متر مكعب ($40\ kg\ m^{-3}$) **معدل النمو النوعي:** 0.029 في الساعة **نسب التلقيح** 1: 7 (حجم/حجم)	1500
إطلاق المنتج تلقائياً (Spontaneous release of biproduct)	**الوزن الجاف الأولي:** ($2.5\ kg\ m^{-3}$) **إنتاجية:** 24 ميلليغرام لكل كيلوغرام في الساعة **الوزن الجاف النهائي:** ($20\ kg\ m^{-3}$) **عطاء الوزن الجاف على الغلوكوز:** ($0.65\ C\text{-}mol/C\text{-}mol^{-1}$) **البقاء على الغلوكوز:** ($0.0083\ C\text{-}mol/C\text{-}mol\ h^{-1}$)	3300
دفع إطلاق المنتج بجعل الخلايا منفذة (Forced release by permeabilisation)	**الوزن الجاف الأولي:** ($9\ g\ kg^{-1}\ DW$) بعد فترة إنتاج تبلغ 21 يوم **الوزن الجاف النهائي:** ($20\ kg\ m^{-3}$) **أخذ الأكسيجين الأقصى:** ($0.0154\ kmol\ m^{-3}\ h^{-1}$)	4300

	لدى ($20\ kg\ m^{-3}$) وزن جاف	
البيربيرين Bererine		
استخدام الكتلة الحيوية لمرة واحدة	**الوزن الجاف الأولي:** ($8\ kg\ m^{-3}$) **الوزن الجاف النهائي:** ($55\ kg\ m^{-3}$) **البيربيرن النهائي:** ($0.07 kg\ kg^{-1}\ DW$) **الزمن الكلي للنمو والإنتاج:** 14 يوم	320
إطلاق المنتج تلقائياً على نحوٍ متقطع	**مفاعل نمو الكتلة الحيوية** **الوزن الجاف الأولي:** ($1.25\ kg\ m^{-3}$) **الوزن الجاف النهائي:** ($40\ kg\ m^{-3}$) **مفاعل إنتاج البيربيرين**	670
إطلاق المنتج تلقائياً على نحوٍ متواصل	**الوزن الجاف الأولي:** ($2.5\ kg\ m^{-3}$) **الوزن الجاف النهائي:** ($20\ kg\ m^{-3}$) **البيربيرين النهائي:** ($0.07\ kg\ kg^{-1}\ DW$) **الزمن الكلي للنمو والإنتاج:** 18 يوم	750
خلايا مقيدة الحركة	**الوزن الجاف الأولي:** ($10\ g\ m^{-3}$) في ($0.5\ m^3$) من حُباب الكالسيوم ألجينات لكل متر مكعب (m^3) من الوسط **البيربيرين النهائي:** ($20\ kg\ m^{-3}$) بعد 100 يوم **تجديد الوسط** كل 10 أيام	535

الاستخدام المتكرر للكتلة الحيوية مقيَّدة الحركة

Repeated use of immobilized biomasses

في حالة استخدام خلايا مقيدة الحركة، سيكون الحجم الضروري من المفاعل الحيوي لتحقيق إنتاج كمية معيّنة من المنتج أكبر من ذلك الضروري لدى استخدام الخلايا الحرة، ويعود هذا إلى الفراغ الذي يأخذه القالب المستخدم في تثبيت الخلايا- مع الافتراض دائماً أن معدلات الإنتاج في النظامين هي ذاتها تقريباً. كما يجب الأخذ بعين الاعتبار كلفة القالب أيضاً. ولكن ، ما يلي ذلك في العملية من وقت فهو أقصر بسبب سهولة الفصل بين الكتلة الحيوية والوسط. إن عمليات إنتاج الأجمالسين التي يمكن أن تُنفذ بهذه التقنية تحتاج إلى كلفةٍ مشابهة لعملية الإنتاج في نظام الإطلاق التلقائي للمنتج من الخلايا الحرة.

نتائج تقديرات الكلفة Results of cost estimates

لدى مقارنة الخيارات المتعددة للعملية (الجدول 12.23)، فإنه من الواضح أن استخدام الكتلة الحيوية لمرة واحدة في عملية الدفعة هو التوجه الأكثر توفيراً. فقد تبيّن في تحليلاتنا أن العمليات المستمرة هي أكثر كلفة من عمليات الدفعة. ويعود هذا إلى تركيز الكتلة الحيوية الأقل المُقدَّر في العمليات المستمرة، الذي هو ضروري لأجل التمكن من فصل الطور السائل الذي يحتوي على المنتج عن المرق. لم يُغنِ إعادة استخدام الكتلة الحيوية المتكررمن التأثير السلبي لتركيز الكتلة الحيوية المنخفض، لأن كلفة الكتلة الحيوية في عمليات التحليل، تمتلك فقط مساهمة محدودة من مجموع التكاليف.

في الواقع، من جوهر المشكلة المادية هي تكاليف الاستثمار في التجهيزات. يحدد عائد الاستثمار إنتاجية النظام، التي هي كمية المنتج الذي تم إنتاجه في كل وقتٍ وحجم ($kg\ m^{-3}\ day^{-1}$). تصبح خيارات العملية ذات أهمية فقط عندما يكون هناك تحسن في الإنتاجية، بحيث يجعل العملية منافِسة لغيرها من العمليات. إن المقارنة بين بيانات الأجمالسين والبيربيرين، تُظهر بوضوح أن

استخدام الطرائق التقليدية لتحسين الأوساط وشروط العملية باستطاعته أن يعطي بالفعل تحسينات هامة في الإنتاجية وكِلَف العملية.

8.5.23 الاستنتاجات Conclusions

إن المزارع الخلوية النباتية هي عمليات قابلة للتطبيق على مستوى ضخم من الإنتاج الصناعي. إلا أن هناك القليل فقط من العمليات التي تم تطويرها بنجاح من أجل إنتاج الكيماويات النباتية الحالية ذات الأهمية التجارية. أما العمليات الأخرى، فإنتاجيتها منخفضة جداً حتى تنافس طرق الإنتاج المتوافرة. فلطالما الربح قليل، حتى لو كانت أسواق معظم المنتجات موطّدة بشكلٍ جيد، سيبقى المال المتوفر للاستثمار في نظام إنتاج جديد من خلال التقانة الحيوية غير كافٍ.

في السنوات القادمة، من المؤكد ستظهر منتجات نباتية من خلال برامج الغربلة فائقة الكفاءة التي تستخدم اليوم لإيجاد مركبات فعالة حيوياً (انظر الفصل الثاني عشر)، مما سوف ينتهي في آخر الأمر إلى أدوية ذات اشتقاق نباتي. فالمزارع الخلوية النباتية تقدم إمكانية إنتاج المادة على الأقل خلال الطور الأول من من عملية تطوير الدواء، بعد ذلك يمكن لطرق إنتاج أخرى أن تُعتمد، والتي يمكن أن تكون أخيراً طريقة الإنتاج المُختارة. إن هذا سيجنب حدوث مشاكل كتلك التي جرى التعرّض لها خلال السعي إلى تحقيق التزويد المناسب من الباكليتاكسل paclitaxel في السنوات الأخيرة.

وفي هذا السياق، تعتبر الهندسة الأيضية أداة هامة لتحسين مصنع خلية النباتات من أجل إنتاج المواد الكيميائية النباتية المرغوبة. فهي (الهندسة الأيضية) يمكن أن تُستخدم في كلٍّ من النباتات والمزارع الخلوية النباتية وحتى في الكائنات المجهرية، عن طريق إدخال مسارات قصيرة إليها (تحولات حيوية). ولكن مع هذا كله تبقى الحاجة إلى مزيدٍ من المعرفة الجذرية بالمسارات المتضمَّنة في عمليات التصنيع الحيوي وكيفية تنظيمها.

Further reading 6.23 قراءات إضافية

Alfermann, A. W. and M. Petersen, “Natural Product Formation by Plant Cell Biotechnology: Results and Perspectives,” *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 43 (1995), pp. 199-205.

DiCosmo, F. and M. Misawa (eds.), *Plant Cell Culture Secondary Metabolism: Toward Industrial Application*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996.

Doran, P. M. (ed.), *Hairy Roots: Culture and Applications*. Amsterdam: Harwood Academic, 1997.

Giri, A. and M. L. Narasu, “Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Applications,” *Biotechnology Advances*, vol. 18 (2000), pp. 1-22.

Oksman-Caldentey, K.-M. and W. H. Barz, *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. New York: Marcel Dekker, 2002.

Schlatmann, J. E., H. J. G. Ten Hoopen, and J. J. Heijnen, “A Simple Structured Model for Maintenance, Biomass Formation, and Ajmalicine Production by Nondividing Catharanthus Roseus Cells,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 66 (1999), pp. 147-157

Spier, R. E. (ed.) *Encyclopedia of Cell Technology*. New York: John Wiley and Sons, 2000.

Su, W. W. “Bioprocessing Technology for Plant Cell Suspension Cultures,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 50 (1995), pp. 189-230.

Verpoorte, R. and A. W. Alfermann, (eds.), *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.

Verpoorte, R., A. Contin, and J. Memelink, “Biotechnology for the Production of Plant Secondary Metabolites,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 1 (2002), pp. 13-25.

Verpoorte, R., R. van der Heijden, W. M. van Gulik, and H. J. G. Ten Hoopen, “Plant Biotechnology for the Production of Alkaloids: Present Status and Prospects,” in: A. Brossi, ed., *The Alkaloids* (San Diego, CA: Academic Press, 1991), vol. 40, pp. 1-187, 1991.

Verpoorte, R., R. van der Heijden, H. J. G. Ten Hoopen, and J. Memelink, “Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for the Production of Fine Chemicals,” *Biotechnology Letters*, vol. 21 (1999), pp. 467-479.

الفصل الرابع والعشرون

عمليات التحويل الحيوي

Biotransformations

بيدرو فرنانديز **Pedro Fernandes**

المعهد العالي للتكنولوجيا، لشبونة ***Instituto Superior Técnico, Lisbon***

جاكيم م. س. كابرال **Joaquim M. S. Cabral**

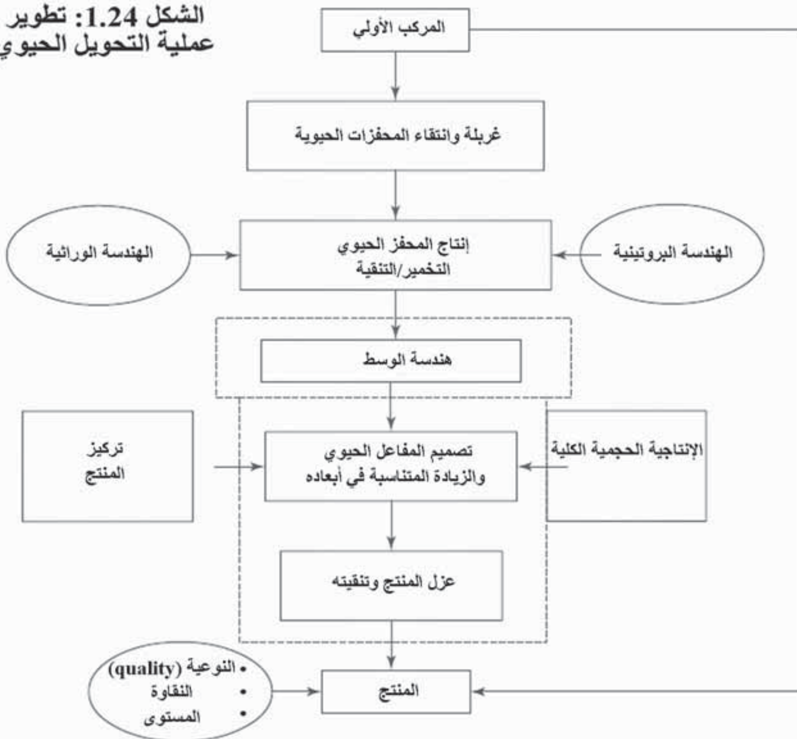
المعهد العالي للتكنولوجيا، لشبونة ***Instituto Superior Técnico, Lisbon***

1.24 المقدمة Introduction

يتناول التحويل الحيوي (Biotransformation) استخدام المحفزات الحيوية (Biocatalysts) لتحويل المركب الأولي (Substrate) إلى منتج في عدد محدود من الخطوات الأنزيمية. إن تأسيس عملية تحويل حيوي فعالة يتطلب اختباراً شاملاً للعوامل التي تؤثر في تطوير المحفز الحيوي المثالي، وأوساط التفاعل والمفاعل الحيوي (Bioreactor) (الشكل 1.24).

حالياً، تستغل صناعة الكيماويات تقانة الأنزيمات في قطاعات متنوعة، تحديداً في قطاعات الغذاء، والأدوية والمنظفات. كما أنه من الملاحظ وجود نزعة قائمة حالياً باتجاه توظيف عمليات تجارية تعتمد على استخدام المحفزات الحيوية في مجالات أخرى (مثلاً في صناعة البوليميرات، والكيماويات الدقيقة (Fine chemicals) والزراعية، وكيماويات متنوعة أخرى). من المتوقع بأنه في المستقبل القريب سيتعزز استخدام المحفزات الحيوية في هذه المجالات والذي سيوسع أكثر، باقترانه مع العمليات الحيوية الموجودة، التأثير العام للتحفيز الحيوي

في الصناعة الكيماوية. إن العمليات الحيوية، مقارنة بمثيلاتها من العمليات الكيماوية، هي أبسط، وأقل تطلباً للمواد الأولية والطاقة، ما يؤدي إلى الحصول على منتجات ذات نوعية أفضل (أي مع شوائب أقل) وتحقيق عطاءٍ أكبر، بالإضافة إلى تقليل الفضلات السامة والمياه الملوثة الناتجة. تقود مثل هذه الصفات إلى تخفيض تكاليف الإنتاج، وبما أن العمليات الحيوية تمتثل بسهولة للتشريعات البيئية المتشددة في الدول التي تراعي مثل هذه التشريعات، فإن هذه العمليات ستكتسب القدرة على المنافسة مع الطرائق التقليدية (Conventional methods) (الكيماوية). وفي أغلب الحالات، ستزيد المنافع قريبة المدى مع استمرار نمو تغلغل المنتج والعملية الحيوية في السوق، مما يقود إلى إنقاص إضافي في الكلفة وتحسينات في أدائها مقارنة مع المنتجات والعمليات المنافِسة. يعرض الجدول 1.24 بعض الحالات التي تمثل تطبيقات المحفزات الحيوية الناجحة في الصناعة.



الشكل 1.24: تطوير عملية التحويل الحيوي

الجدول 1.24: أمثلة على عمليات حيوية ذات مستوى تجاري

الصنف	المنتج	المادة الأولية	المحفز الحيوي	الشركة	مستوى الإنتاج (طن/السنة)
الكحول الأميد (Amides) والأمين (Amines)					
	الأكريلاميد (Acrylamide)	أكريلونيتريل (Acrylonitrile)	خلايا *Rhodocccus rhodchrous* JI محتجزة في البولي أكريلاميد (Polyacrylamide)	شركة ميتسوبيشي رايون المحدودة (Mitsubishi Rayon Co.، Ltd)	20 000
	كحول نقي من حيث مصاوغته المرآتية (Enontiomerically)	كحول أميني أولي راسيمي[1] (Racemic primary aminoalcohols)	أنزيمات الليباز(Lipases) المثبتة	BASF	1 000
	أمينات غير متناظرة مرآتياً (Chiral amines)	أمينات راسيمية (Racemic amines)	أنزيمات الليباز المثبتة	BASF	20 000 <

أحماض أمينية				
L-Methionine: **L-Tryptophan،** **L-Phenylalanine, L-Valine**	أسيل-D، L-أحماض أمينيةD-Acyl)، L-Amino acids)	أنزيم أمينوأسيلاز (Aminoacylase)، ارتباط أيوني مع سيفاديكس- DEAE (DEAE-sephadex)	Tanabe	[2]21-6
L-Alanine	حمض الفوماريك وأمونيا (Fumaric acid and ammonia)	خلايا *E. Coli* و *Pseudomonas docunhae* محتجزة في K-كراجينان (K-Carrageenan)	Tanabe	[3]100
L-Aspartic acid	حمض الفوماريك وأمونيا	خلايا *E.coli* محتجزة في K-كراجينان ، أنزيم لاياز الأمونيا (Ammonia lyase) المثبت	Tanabe DSM	[3]100 1000
مضادات الحيوية				
7-حمض أمينوسيفالوسبورونيك (7-Aminocephalosporanic acid)	سيفالوسبورين C (Caphalosorin C)	أنزيم أوكسيداز الحمض الأميني-D (D-Amino acid oxidase)	Biochemi (Novarties)	حوالى 2 000
6-حمض أمينوبنيسيلانيك (6-Aminopenicillanic acid)	بنيسيلين V/G (Penicillin G/V)	أنزيم أسيلاز البينيسيلين (Penicillin acylase) المثبت	DSM	6 000

اللاكتامات (Lactams)					
	(−)−لاكتام، مركب وسيط لإنتاج الكاربوفير ™(Carbovir™) والأباكافير ™ (Abacavir™)	لاكتام راسيمي	أنزيم ألفا−لاكتاماز (A-Lactamase) المأشوب	Chirotech (Dow chemicals)	عشرات
كيماويات N− متباينة الحلقات (N-Heterocyclic chemicals)					
	3R−Cis−(أسِتيلوكسي)−4− فينيل−2−أزِتيدينون أسيتات [Cis-3R-(Acetyloxy)-4-Phenyl-2-azetidinine acetate] (وسيط في تصنيع البَكتيلاكسيل (Peclitaxel)، تاكسول (Taxol))	أسيتات راسيمي −3−*Cis* (أسيتيلوكسي)−4−فينيل− 2−أزِتيدينون (Cis-3-(Acetyloxy)-4-Phenyl-2-azetidinone)	أنزيم ليباز (Lipase) مثبت	Bristol–Myers–Squibb	_(4)

الصنف	المنتج	المركب الأولي	المحفز الحيوي	الشركة	مستوى الإنتاج (طن/السنة)
	6–هيدروكسي حمض النيكوتين (6-Hydroxynicotinic acid)	3–سيانوبيريدين (3-Cyanopyridine)	طفرات من نوع *Agrobacterium* DSM 6336	Lonza	غير متوفر
	نياسيناميد (Niacinamide)	3–سيانوبيريدين	خلايا *Rhodococcus rhodochrous* JI	Guangzhou fine chemicals/lonza	3 000
	نيكوتين أميد (Nicotinamide)	3–سيانوبيريدين	خلايا *Rhodococcus rhodochrous* JI محتجزة في بولي أكريلاميد	Lonza	4 000
البوليميرات					
	الديكسترينات الحلقية (Cyclodextrins)	النشاء	تحويل أنزيمي	Wacker specialties	3 000
	بولي يوريثان (Polyurethane)	ثمالات هايدروكسي حمض الكربوكسيل المفتوحة (Aliphatic hydroxyl carboxylic acid)	ليباز مرتبط بريزين أكريليكي (Acrylic resin) ذو مسام كبيرة	Baxenden	2

متعدد حمض الخل (Polyacetic acid)	ديكستروز (Dextrose) غير منقى		Cargill Dow LLC	140 000
المُحلِّيات				
أسبارتام (Aspartame)	L-حمض الأسبارتيك المحمي بذرة نيتروجين، D/L- فينيل ألانين ميثيل الإستر (D/L-Phenylalanine methyl ester)	ثيرمولايسين (Thermolysin) مثبت	Holland Sweetener Company	1 000
شرابات عالية الفركتوز	الذرة	ألفا-أميلاز، أميلوغلوكوسيداز، بولولاناز، غلوكوز أيزوميراز مثبت (A-Amylase، amyloglucosidase، Pullulanase، immobilised glucose isomerase)	A. E. Staley, ADM, Cargill	23 000 000
الفيتامينات				
رايبوفلافين Riboflavin (فيتامين B2)	غلوكوز	بكتيريا *Bacillus subtilis* (مطفرة)	Hoffman La-Roche	2 000

مركبات متنوعة في الزراعة والصحة

أندروستينيدايون (Androstenedione)	سيتوستيرول (Sitosterol)	أنواع من بكتيريا *Mycobacterium* مطفرة	Schering	1 000
L–كارنيتين (L-Carnitine)	4–بوتيروبيتان (4-Butyrobetaine)	أنواع من *Rhyzobia* مطفرة	Lonza	
S–2 حمض كلوروبروبيونيك (Chloropropionic CPA) (مركب وسيط زراعي)	CPA راسيمي	بكتيريا من نوع *Pseudomonas* مأشوبة	Avecia	2 000
وسيط 5–سيانوفاليراميد (5-Cyanovaleramide) من اجل إنتاج مبيد الأعشاب مايلستون™ (Milestone^{tm})	أديبونايترايل (Adiponitrile)	بكتيريا *Pseudomonas* *chlororaphis* B23 محتجزة في حبيبات ألجينات الكالسيوم	Commercial-Dupont	1 00
5–هيدروكسي بيرازين حمض الكربوكسيل (5-Hydroxypyrazinecarboxylic acid)	2–سيانوبيريزين (2-Cyanopyrazine)	خلايا *Agrobacterium* DSM 6336 الكاملة	Lonza	
S–إيبوبروفين (S-Ibuprofen) (دواء مضاد	أيبوبروفين راسيمي	أنزيم ليباز مثبت (Lipase) (غشاء من الألياف المفرغة)	Sepracor	–[4]

للالتهاب غير ستيرويدي (Non-Steroidal anti-inflamatory drug)				
S-نابروكسين Naproxen (دواء مضاد للالتهاب غير ستيرويدي)	نابروكسين ميثيل الإستر (Naproxen methyl ester) راسيمي	أنزيم الإستراز (Esterase)	Chiroscience	I[5]
(+)-(2S،3R)-Trans-3-(4-ميثوكسي فينيل)- حمض الغلايسيديك ميثيل الإستر [(+)-(2S،3R)-Trans-3-(4 methoxy-phenyl)-glycidic acid methylester] (ديلتيازيم Diltiazem هو المركب السالف)	مزيج راسيمي	أنزيم ليباز مثبت	Tanabe BASF	–[6]
استخدامات متنوعة في مجال البيئة والغذاء واللباب والورق				
تبييض اللباب	تحليل بوليمر الزايلان	الزيلاناز (Xylanase)	Domtar، Oji	

	mills ومصانع أوراق أخرى	(Xylin)		(Pulp bleaching)
	Cereol/Lurgi	أنزيم فوسفولايباز A2 (Phospholipase A2)	زيوت البذور	إزالة أصماغ الزيت النباتي
	Windel Textil Gmbh and Co.	أنزيم الكتالاز (Phospholipase A2)	بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)	ماء وأوكسيجين
8.5 من كبريت الزنك يومياً	Budel Zink	بكتيريا مُختزِلة للكبريت (Sulphate)	كبريتات الزنك (مائي)	كبريت الزنك (صلب)

ملاحظات:

(1) كحول راسيمي (racemic alcohol): كحول يحتوي على كميات متساوية من المصاوغات المرآتية اليمنى واليسرى.

(2) أطنان في الشهر في العملية المستمرة .

(3) طن في الشهر .

(4) مستوى متعدد الكيلو غرامات.

(5) أطنان في السنة.

(6) عدة مئات من الأطنان في السنة.

تمتلك المحفزات الحيوية مقارنة بالمحفزات الكيماوية ميزات إنتقاء الموقع (Regioselectivity) وميزات انتقاء فراغية (Stereoselectivity)، التي تقود إلى منتجات متماثلة الصورة وحيدة التناظر (Enantiomeric products) تمتلك المتطلبات الرقابية اللازمة للاستخدام في المجال الدوائي، والغذائي والزراعي. كما أن هذه المحفزات هي أيضاً فعالة من حيث الطاقة، إذ تعمل على قيم معتدلة من درجات الحرارة، والضغط والرقم الهيدروجيني (Ph).

لقد نُفذت عمليات تحويل حيوية باستخدام محفزات حيوية متنوعة، كالأنزيمات المعزولة (Isolated enzyes)، والأنزيمات والخلايا المثبتة (Immobelized). كما قادت تطورات تقانة الـــ DNA المأشوب (Recombinant DNA technology) إلى تحسينات في إنتاج الأنزيمات في كائنات مضيفة مختلفة، مما أعطى مهندس العملية الحيوية خياراً أكبر في انتقاء المحفز الحيوي.

إن المحفز الحيوي المثالي يجب يكون انتقائياً، فعالاً وثابتاً تحت شروط عمل المفاعل الحيوي، وبذلك، فإنه ليس من الضروري أن يكون تقليدياً من حيث تركيبه، وتركيزه، والضغط ودرجة الحرارة المستخدمتين. بل من الضروري، وبصورة خاصة، تقويم أداء المحفز الحيوي في أوساط غير تقليدية (مثلاً المحاليل العضوية (Organic solutions) والموائع فوق الحرجة (Super-critical fluids)).

تكمن المسألة الأساسية في عمليات التحويل الحيوية في توفر المحفزات الحيوية المناسبة. لذلك هناك حاجة إلى عمليات غربلة (Screening) وتقنيات انتقاء (Selection) أكثر منطقية من أجل: (أ) عزل محفزات حيوية، مثل أنزيمات وخلايا، قادرة على تحفيز تفاعلات جديدة ذات أهمية إقتصادية؛ و(ب) انتقاء وتصميم محفزات مناسبة للاستخدام الصناعي تتمتع بثباتية في العمل (Operational stability) وخصائص حركية (Kinetic properties) محسنة. ويتطلب هذا فهماً أكبر لآليات تمسخ (Denaturation) البروتين واضمحلال فعاليته التحفيزية (Catalytic activity) تحت شروط عملية الإنتاج، وأيضاً تقييم للطرائق المتبعة من أجل المحافظة على ثباتيته وتحسينها ، مثلاً على طريق التعديلات

الكيميائية (Chemical modifications)، والتثبيت (Immobilization) والهندسة البروتينية (Protein engineering).

من المهم أيضاً، أثناء أمثلة (Optimisations) العملية ككل، تعزيز أداء المحفز الحيوي وما هو متوقع منه خلال عمله في أوساط التفاعل، وخصوصاً في الأوساط متعددة الأطوار(Multi-phasic media) التي تضم طوراً صلباً، مثلاً محفزات حيوية مثبتة، وطور سائل (مائي) أو طورين سائلين (أحدهما مائي والآخر عضوي). كما من المهم جداً الحصول على معطيات ونماذج عن النقل (Transport) الفيزيائي/الكيميائي وعن ظاهرة تكوّن السطح البيني (Interfacial phenomenon) بحيث يمكن الاعتماد عليها في أمثلة الوسط. إن هندسة الوسط تلعب دوراً هاماً في تعريف عملية التحفيز الحيوية وفي تقييم تأثير مركبات الوسط في المحفز الحيوي.

يجب أن يكون المفاعل الحيوي الأمثل بسيطاً، آمناً، مضبوطاً بشكل جيد، سهل التصميم وذا مرونة في الأداء. يتطلب تصميم المفاعل الحيوي معرفة في حركية التفاعل (Reaction kinetics) بالإضافة إلى ديناميكية (حركية) السائل، وتبدد (Dispersion) المركب الأولي وانتقال الكتلة. كما يجب الأخذ بعين الاعتبار، فيما يتعلق بالتفاعلات الحيوية متعددة الأطوار، الظواهر التي تحدث عند السطوح الفاصلة (البينية)، وتفرق (Partitioning) المركب الأولي والمنتج، وانفصال الأطوار السائلة.

2.24 انتقاء المحفز الحيوي Biocatalyst Selection

إن الفهم الأفضل والأعمق لعلم الأحياء الأساسي (Fumdamental biology) وعلم الأنزيمات (Enzymology)، مقروناً بتطور المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics) والطرائق ذات الإنتاجية العالية (High-through put methods)، يوسع حالياً نطاق المحفزات الحيوية (Biocatalysts)، بالإضافة إلى تعزيز أثر التقنية الأنزيمية في الصناعة. تتطور حالياً، وبسرعة، قواعد بيانات شاملة تجمع معطيات عن الأنزيمات، كقاعدة BRENDA

(http://www.brenda.uni-koeln.de). ومن المتوقع أن يتعزَّز أكثر هذا المنحى وذلك لوضع نظم علم بلوريات (Crystallography) مؤتمتة بشكل كامل وذات انتاجية عالية موضع الاستخدام، مما يمكن من تحديد بنية البروتينات (Protein structure) بسرعة أكثر (أقل من 100 ساعة). إلى جانب ذلك، فقد تم تطوير قواعد بيانات مخصصة لتحديد بنية البروتينات الثلاثية الأبعاد (مثلاً http://www.structuralgenomics.org). كما حسّن تطوير الربوتيات (Robotics) والبرامج الحاسوبية (Software)، مع توفر أدوات تحليلية محسنة ومؤتمتة بشكل كامل، ومنهجيات غربلة وتحسين المحفزات الحيوية (انظر أيضاً الفصل الثاني عشر).

بعد اختيار مادة البدء (Starting material) المناسبة من أجل تحويلها إلى المنتج، من الضروري اختيار المحفز الحيوي الملائم ذي فعالية (Activity)، وانتقائية (Selectivity) وثبات (Stability) مناسبة للعمل تحت شروط التشغيل المطلوبة (حرارة، وتركيز الأملاح، والرقم الهيدروجيني، والمحاليل العضوية المستخدمة، وتراكيز المركب الأولي والمنتج). هناك عدة استراتيجيات يمكن اتباعها للحصول على المحفز الحيوي المناسب والوصول إلى التحويل الحيوي السديد: (أ) الغربلة بحثاً عن محفزات حيوية جديدة، (ب) استخدام المحفزات الحيوية المتواجدة، و(ج) التعديل الوراثي للمحفزات الحيوية المتواجدة.

1.2.24 الغربلة بحثاً عن محفزات حيوية جديدة

Screening for novel biocatalysts

ما زال انتقاء كائنات مجهرية جديدة ذات فعاليات مبتكرة عملية تستحق الاهتمام، مع الأخذ بعين الاعتبار التنوع الكيميائي الحيوي المدهش الموجود في الطبيعة. تتطلب غربلة أعداد كبيرة من الكائنات وجود طرائق كشف (Detection methods) رخيصة الثمن، بسيطة، سريعة، انتقائية، ويفضل أن تكون قابلة للأتمتة، وذلك من أجل تسهيل هذه العملية التي عادة ما تكون متعبة.

يمكن أن تكون طرائق الانتخاب الانتقائي (Selective selection) للمستعمرات (Colonies) على أطباق الزرع مفيدة جداً كما تَبيَّن من خلال عزل الكائنات المجهرية القادرة على إضافة مجموعة الهيدروكسيل (OH) إلى L - تيروزين (L-tyrosin) لتحويله إلى L- دوبا (L-DOPA)، وهو دواء يستخدم في معالجة مرض الباركنسون (Parkinson)، إذ يتحول لون المزارع التي تنتج L- DOPA إلى البنفسجي الغامق كنتيجة لتفاعل L-DOPA مع أيونات الحديد المضافة إلى أطباق الآغار.

لقد نُفذت أيضاً عملية انتقاء للجراثيم وذلك بوجود تراكيز عالية من المركب المستهدف. فقد استُخدمت هذه المقاربة من أجل عزل سلالات قادرة على استيعاب حمض البنزويك (Benzoic acid-assimilating strains) بغية إنتاج cis,cis− حمض الميوكونيك (Cis,cis-muconic acid) من حمض البنزويك. كما اتُبعت مقاربات مشابهة من أجل عزل أنزيمات قادرة على تحليل (إضافة ماء) النيتريل (Nitrile-hydrolyses)، كأنزيم هيدرتاز النيتريل (Nitrile hydratase)، والنيترلاز (Nitralase) والأميداز (Amidase)، وهي أنزيمات تمتلك إمكانيات كبيرة للعمل كمحفزات لإنتاج أميدات(Amides) وأحماض عالية القيمة من النيتريلات الموافقة.

غالباً ما تكون المقاومة للمحاليل العضوية معياراً مهماً في انتقاء المحفز الحيوي المناسب. فقد تم عزل سلالات *Pseudomonas* من خلال مقدرتها على النمو بوجود التولوين (Toluene) والهيدروكربونات العطرية والمفتوحة (Aromatic and aliphatic hydrocarbons) ومركبات الكحول ذات السلاسل الطويلة (Long chain alcohols). وعليه، تعتبر هذه السلالات وفعالياتها الأنزيمية مصادر تحفيز حيوي هامة من أجل تفكيك المركبات المؤذية، إضافة إلى تصنيع مركبات عديمة التناظر المرآتي (Chiral) هامة. إن الكائنات المحبة للشروط المتطرفة (Extremophiles) تتلقى الكثير من الاهتمام، حيث من المحتمل أن توفر هذه الكائنات المجهرية التي تنشأ في بيئات متطرفة محفزات

حيوية قادرة على تحمل شروط التفاعلات الصناعية التي غالباً ما تكون قاسية. لقد تم التعرف على أنواع مختلفة من هذه الكائنات، كتلك المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة (Thermophiles)، والمرتفعة جداً (Hyper-thermophilic)، والمحبة لدرجات الحرارة المنخفضة (Psychrophilic)، والمحبة للأملاح (Halophiles) (متعايشة مع تراكيز أملاح عالية)، وأيضاً تلك المحبة للعيش في أوساط قلوية (Alkaliphiles)، وحامضية (Acidophiles) وتحت ضغط مرتفع (Piezophiles).

2.2.24 استخدام المحفزات الحيوية المتواجدة

Use of existing biocatalysts

إن إحدى الطرائق المعروفة جداً من أجل تحقيق التحويل الحيوي (Biotransformation) المنشود هو استخدام المحفزات الحيوية المتواجدة (مثلاً الأنزيمات التجارية) في تحويل مركبات أولية طبيعية وغير طبيعية. حالياً تخضع نوعية (Specificity) أنزيمات اللايباز (Lipase) والبروتياز (Protease) تجاه المركب الأولي إلى أبحاث مكثفة. فمقدرة أنزيمات اللايباز لا تقتصر على تحليل المركبات الأولية من ثلاثيات أسيل الغليسيرول (Triacylglycerols)، إنما أيضاً هي قادرة على تحليل إسترات (Esters) أحادية، وثنائية، وثلاثية لسلاسل مجموعات الأسيل (Acyl) المتنوعة وذات الأطوال المختلفة .

قد يقود استخدام الأنزيمات المتواجدة تحت شروط تفاعل مختلفة إلى إيجاد محفزات حيوية مناسبة للتحويل الحيوي المنشود. مثلاً، استخدمت أنزيميات الليباز (Lipase) من أجل تنفيذ تفاعلات تصنيعية في أوساط تحت فعالية مائية (Water activity) مضبوطة، مثل، تفاعلات الأسترة (Esterification)، والأسترة البينية (Inter- esterification) وتوزيع الجزيئات التبادلي (Trans-esterification). وقد نُشِرت طرائق لأمثلة إنتقائية المصاوغات المرآتية لأنزيم الليباز، تحديداً عن طريق تنفيذ تعديلات غير تشاركية (Non-covalent modifications) عليه وعن طريق ضبط التوتر السطحي (Surface tension) للمستحلَب (Emulsion).

3.2.24 التعديل الوراثي للمحفزات الحيوية المتواجدة

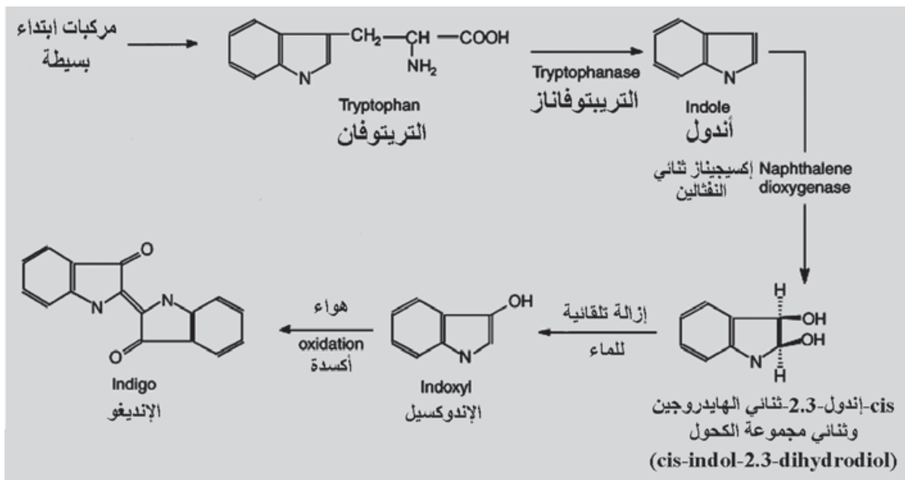
Genetic modification of existing biocatalysts

طريقة أخرى للحصول على محفز حيوي، هي عن طريق إنشاء محفز حيوي جديد في الحي (In Vivo) (*هندسة مسار أيضي*) وفي الزجاج (in vitro) (*هندسة البروتين*). لقد تم تطبيق الهندسة الوراثية في الحي على نطاق واسع من أجل الحصول على كائن مأشوب يحتوي على الفعالية الأنزيمية المنشودة. تضم حيثيات التطفير التي تقود إلى فعاليات أنزيمية جديدة نقل الجينات، وتضاعفها (Gene duplication)، ودمجها (Gene fusion)، والتأشيب فيما بينها، وحذف (Deletion) أو إدخال (Insertion) قطع من الجينات، والقيام بواحدة أو أكثر من الطفرات الموضعية (Single-site mutations)، أو أيضاً تنفيذ مجموعة من هذه الحيثيات. أحد الأمثلة على هندسة المسار الأيضي هذه هو إنتاج الصبغات (Dyes)، كالتصنيع الحيوي للصباغ ذي اللون النيلي المسمى إنديغو Indigo في بكتيريا *E. Coli* (الشكل 2.24). يجري هذا عن طريق تجميع الجينات المُشفِرة لتشكيل التريبتوفان، والجين الذي يحدد أنزيم التريبتوفاناز (Tryptiphanase) وشدفة من بلازميد[1] NAH من بكتيريا *Pseudomona* المُشفِرة لأنزيم الأوكسيجيناز الثنائي للنفثالين (Naphthalene dioxigenase)، على مَشْغَل حيوي[2] (Operon) واحد، للحصول على بكتيريا *E. Coli* مأشوبة قادرة على تصنيع الإنديغو من مركبات ابتداء بسيطة.

---

[1] البلازميد (plasmid) وهو عنصر جيني خارج الكروموزومات متنقل يتواجد في بعض البكتيريا. يتألف من جزيئات DNA مزدوجة حلقية مكوّن من 1 إلى 200 زوج قاعدي. وهو يتضاعف بشكل مستقل عن كرومزومات البكتيريا، ويضفي عدة ميزات على البكتيريا (كمقاومة المضادات الحيوية والعناصر الثقيلة). إن البلازميدات هي مرغوبة في تقنية الـــDNA المأشوب. وهي يمكنها أن تحمل حتى 10 أزواج قاعدية من الـــDNA المُدخل.

[2] مَشْغَل (operon) هي وحدة وراثية متكاملة وظيفياً تتحكم في التعبير عن الجينات في البكتيريا، وتتألف من جين واحد أو أكثر وحاثّ يتحكم في التعبير عن الجينات فيها من خلال تنظيم نسْخها.



الشكل 2.24 مسار أيض وهندسة تخليق الانديغو (Indigo Biosynthesis).

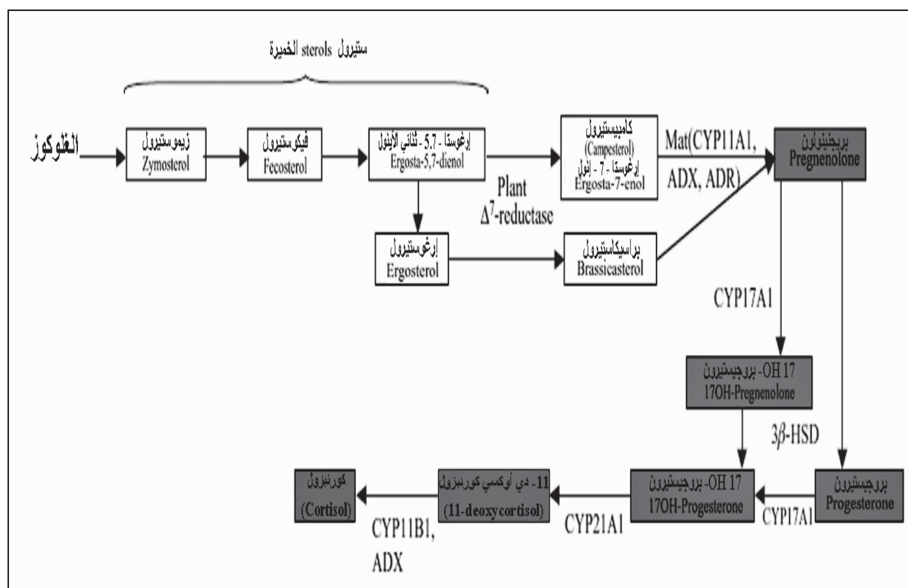
مثال آخر على هندسة المسار الأيضي، وهو إنتاج الكورتيزول (Cortisol) من الغلوكوز باستخدام خلايا خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. في هذا السياق، جرى التعبير عن مسار تصنيع حيوي اصطناعي (Artificial biosynthetic pathway) يشمل 13 جيناً تمت هندستها وراثياً في سلالة واحدة من خميرة *S. Cerevisiae*. وقد استخدم المسار الكامل لتصنيع الكورتيزول حيوياً، مسار تصنيع حيوي طبيعي يتم داخل الخميرة، وتكرار لنفس المسار باستخدام أنزيم Δ^7–ريدكتاز (Δ^7-reductase) النباتي بالإضافة إلى خطوات أنزيمية أخرى تحفز بواسطة ثمانية بروتينات من الثدييات، والتي تحاكي تصنيع غدة الكظر (Adrenal gland) للكورتيزول. تضمَّنت أنزيمات الثدييات هذه الدخيلة على نظام التعبير في الخميرة الأدرينودوكسين المتقدري (Mitochondrial adrenodxin) الناضج، والسيتوكروم CYP11B1 المتقدري، وريدكتاز الأدرينودوكسين (Adrenodoxin reductase) والسيتوكروم CYP11A11 الناضجَيْن، وديهايدروجيناز 3–بيتا–هيدروكسي ستيرويد (3-B-hydroxysteroid dehydrogenase)، والسيتوكرومات CYP17A1 و CYP21A1. وأنزيمات السيتوكروم (Cyps) هي منتمية إلى عائلة الــ P_{450} العليا (P450 superfamily) التابعة لأنزيمات المونوأوكسيجيناز (Monooxygenases) (للتفاصيل حول أنزيمات P_{450} انظر http://www.icgeb.org./~P450srv/). أما أنزيمات الأدرينودوكسين

والأدرينودوكسين ريدكتاز فهي حوامل للإلكترونات (Electron carriers). لقد مكّن التعديل الإضافي على نظامي المتقدرة، وموازاة التدفق الأيضي (Metabolic flux equilibration) وتعطيل التفاعلات الجانبية غير المرغوبة المرتبطة بمنتجات جينات ثلاثة، من إنتاج الكورتيزول من مصدر كربوني بسيط (مثلاً الغلوكوز؛ الشكل 3.24).

تتجلى المقاربة الأخرى لتعديل بروتين/أنزيم متواجد أو ابتكار بروتين جديد ذي مواصفات محددة مسبقاً في استخدام هندسة البروتينات. يمكن النظر إلى عملية هندسة البروتينات كدورة تفاعلية (Interactive cycle) بين عدة خطوات متصلة ببعضها البعض (دورة هندسة البروتينات). لقد كان هدف هندسة البروتينات هو تبيان العلاقة المتبادلة بين البنية (Structure) والوظيفة (Function) عند البروتينات واستخدام هذه المعلومات في تطوير بروتينات جديدة/معدَّلة (أنزيمات) ذات مواصفات محسنة من أجل استعمالها في عمليات التصنيع الحيوي. وكمثال توضيحي هو تصميم طفرات السبتيليزين[3] (Subtilisin) ذات الخصائص المعدلة (من حيث النوعية تجاه المركب الأولي وسيماء فعالية الرقم الهيدروجيني ph activity profile) والثباتية الحرارية (Thermal stability) والتأكسدية (Oxidative stability) المحسنة. مثلاً، في حالة السبتيليزين BPN' هناك حمضان أمينيان من الميثيونين هما Met^{124} و Met^{222} حساسان بشكل خاص للأكسدة (Oxidation). لذلك، من أجل منع التأثير السلبي الناجم عن تشكل ميثيونين السلفوكسيد (Methionine sulfoxide)، فإنه يمكن استبدال الميثيونين، عن طريق التطفير الموجه في الموقع (Site-directed mutagenesis)، بحمض أميني غير متأكسد (Non-oxidative aminoacid)، مثل الألانين (Ala)، أو السيرين (Ser)، أو الليوسين (Leu)، من دون أن يكون هناك خسارة لأكثر من 12–53% من الفعالية الأساسية للأنزيم. تستخدم حالياً طفرة Met^{222}–Ala^{222}

[3] السبتيليزين (subtilisin): هو أنزيم حال للبروتيين.

وذلك باستبدال الميثيونين في الموقع 222 بالألانين لإنتاج أنزيم التنظيف: الديورازايم (Durazyme).



الشكل 3.24: مسار تصنيع حيوي اصطناعي لإنتاج الكورتيزول من الغلوكوز باستخدام سلالة خميرة saccharomyces cerevisiae المأشوبة. ADX، أدرينودوكسين (adrenodoxin)، ADR، ريداكتاز الأدرينودوكسين (adrenodoxin reductase)، HDS-β، ديهيدروجيناز 3- بيتا-هيدروكسيستيرويد-(3-β hydroxysteroid dehydrogenase)، (مأخوذ عن:

F. N. Szczebara, C. Chandelier, C. Villeret [et al.], "Total Biosynthesis of Hydrocortisone from a Single Carbon Source in Yeast," *Nature Biotechnology*, vol. 21 (2003), pp. 143-149.

لقد تم اكتساب هندسة المحفزات الحيوية وهندسة مسارات التصنيع الحيوي إلى حدٍ كبير عن طريق تقنية التطور الموجه (Directed evolution technology) كونها تقدم أداة فعالة لأمثلة الفعالية الأنزيمية بشكلٍ سريع من غير الحاجة إلى معلومات عن بنية الأنزيم وميكانيكيته (Mechanistic information). وفي حساب الأمثلة الدارْوَني (Darwanian optimization algorithm) المتكرر، فإنه يجري ابتكار التنوع الجزيئي بواسطة التطفير العشوائي و/أو تأشيب الجين أو عائلة من

الجينات المستهدفة المتعلقة ببعضها البعض. يتم التعرف على الجينات المشفرة للأشكال المحسنة بواسطة طرائق غربلة عالية الأداء (High-through put) (انظر الفصل الثاني عشر) التي تستخدم كآباء لدورة تالية من التطور. لقد استخدمت هذه الأداة لتطوير محفزات حيوية ذات ثباتية معززة، مثل أنزيم أميدوهيدرولات (N-carbamyl-D-amino-acid) amidohydrolase من البكتيريا *Agrobacterium Tumefaciens*، وهو أنزيم يستخدم حالياً في الإنتاج الصناعي للأحماض الأمينية ذات الوضعية –D (D-amino-acids)، أو أنزيم بيروكسيداز الجرجار (Horseradish peroxidise)؛ ولتعزيز الثباتية والفعالية اللتين هما ميزتان لأنزيمات مختلفة من السبتالين E (Subtilisin E) وإستيراز الــp–نيترو بينزيل -P) nitrobenzyl esterase) المحبَّين للحرارة المعتدلة (Mesophilic) والسبتالين S41 (Subtilisin S41) المحب للبرودة (Psychrophilic). كما يمكن تحسين الفعالية التحفيزية، كما لوحظ في أشكالٍ من أنزيم ديكاربكسيلاز البينزويل فورمات (Benzoyl-formate decarboxylase) المنتجة من قبل بكتيريا *Pseudomonas putida*، والتي تمتلك فعالية ربط بالكربون (Carboligase activity) أكبر بخمس مرات من تلك التي يمتلكها الشكل البري لهذا الأنزيم. وقد تم أيضاً إحراز زيادة في فعالية الأكسدة لدى أنزيم Toluene *ortho*-monooxygenase المنتج من قبل بكتيريا *burkholderia cepacia* G4 لكل من الإيثانات المكلورة (Chlorinated ethenes) والنفثالين (Naphthalene).

علاوة على ذلك، من الممكن التوصل إلى تعديل النوعية (Specificity) تجاه المركب الأولي، مما يسمح لأنزيم أوكسيداز الغلاكتوز(Galactose oxidase) باستخدام الغلوكوز كمركب أولي. هناك أهداف أخرى تم تحقيقها من خلال هذه المقاربة تضم: زيادة نوعية الانزيمات، كما يلاحظ مع انتقائية أنزيم الهيدانتيوناز-D) selective hydantionase) المطفَّر للوضعية –D (90% *Ee*) وهو الذي تم الحصول عليه من الشكل البري الذي كان يبدي 40% *Ee* انتقائية للوضعية -D؛ تغيير الانتقائية الفراغية (Stereoselectivity)، كما ظهر في الشكل الأنزيمي للــ D-hydantoinase المأخوذ من أنواع بكتيريا *Arthrobacter* DSM-9771 تجاه

المركب L-5-(2-methylthioethyl) hydantoin ؛ إضافة انتقائية وفعالية جديدة ، كما بدا في أشكال أنزيم هيدرولاز الترايازين (Triazine hydrolase) التي بإمكانها تحليل الـــTriazines وهي مواد لم تكن تشكل مركبات أولية للأنزيم الأصل، أو أنزيم داي أوكسيجيناز التولوين (Toluene dioxygenase) المطفَّر الذي يمكنه قبول 4− بيكولين (4-picoline) كمركب أولي لتحويله إلى المركب المشتق منه 3− هايدروكسي (Hydroxy−3). لقد استُخدم تطور المسارات الموجه من أجل زيادة إنتاج مركبات الكاروتينويد (Carotenoid) في بكتيريا *E. Coli* بمقدار الضعفين؛ لابتكار مركبات كاروتينويدية جديدة؛ لاستخراج أنزيم الـــ phytoene desaturase من البكتيريا[4] *Rhodobacter sphaeroides* وهو أنزيم منتِج للنيوروسبورين (Neurosporene)؛ لإنتاج الليكوبين (Lycopene)؛ أو لزيادة العطاء من مركب Cis-(1S,2R)-indandiol، وهو مركب سالف في مسار تصنيع حيوي تمت هندسته لإنتاج المنتج الدوائي Crixivan، بواسطة شكل من أنزيم الـــ Toluene deoxygenase المستخرج من بكتيريا *P. Putida*.

يتطلب تطوير مكتبات ضخمة لمحفزات حيوية مطفرة، تم ابتكارها بواسطة التطور الموجه، قوة تجريبية من أجل الوصول إلى الفعالية، وهذا يتم أساساً عن طريق قياس تحويل المركب الأولي إلى منتج من خلال بعض الوسائل. تنطوي مثل هذه التجارب العالية الأداء، والتي يتوجب خلالها تحليل عدة مئات أو آلاف من العينات يومياً، على مهمة ضخمة بحيث يصبح ممكناً القيام بتحليلها فقط عن طريق تطوير اختبارات لونية (Cromogenic) أو متفلورة (Fluorogenic)، وذلك بسبب كون تقنيات الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي (HPLC)، والكروماتوغرافيا الغازية (GC) والرنين المغناطيسي النووي (NMR) غالباً ما تكون غير عملية لأنها بطيئة جداً ومكلفة جداً (تمت الإشارة بالتفصيل إلى هذه الميزات التي تتمتع بها تقنيات الغربلة العالية الأداء في الفصل الثاني عشر).

---

[4] البكتيريا البنفسجية *Rhodobacter sphaeroides* هي بكتيريا قادرة على الحصول على الطاقة من خلال التمثيل الضوئي وهي بكتيريا لاهوائية، ولكنها قادرة على استخدام الكربون العضوي من خلال التخمر والتنفس الهوائي واللاهوائي، وقد عزلت هذه البكتيريا من البحيرات العميقة ومياه المستنقعات.

3.24 تثبيت (تقييد حركة) المحفز الحيوي وأداؤه

Biocatalyst Immobilization and Performance

1.3.24 تثبيت المحفز الحيوي Biocatalyst immobilization

إن تثبيت (تقييد حركة) المحفزات الحيوية من أجل الدراسات المخبرية، وتطبيقات طبية وتحليلية وعمليات صناعية على نطاق واسع هو حالياً تقنية واسعة الانتشار. يمكن تعريف عملية التثبيت (Immobilization) بأنها حجز المحفز الحيوي داخل نظام المفاعل الحيوي، مع الإبقاء على فعاليته الحيوية وثباتيته، بحيث يمكن أن يستخدم مراراً ويدرِج الجدول 2.24 بعضاً من الميزات والمحدوديات التي يمكن أن تنشأ عن استخدام المحفزات الحيوية المثبتة.

تتراوح المحفزات الحيوية التي يمكن تقييد حركتها بين أنزيمات منقّاة وخلايا ميكروبية حية، بالإضافة إلى أنسجة حيوانية ونباتية. يمكن للأنزيمات المعزولة أن تعطي فعاليات عالية لكل وحدة من الكتلة أو مول منها، ونوعية عالية، وأقل قدر من التفاعلات الجانبية. إلا أن تحضيرها غالباً ما يكون صعباً ويتطلب كلفة عالية، كما أنها كثيراً ما تكون غير ثابتة، وتتطلب، في كثير من الحالات، نظم تجديد من العوامل المساعدة التي تعمل معها على التوازي. ونظراً إلى طبيعتها الكيميائية البسيطة نسبياً، مقارنة بالعُضَيَّات أو الخلايا الكاملة، فإن الأنزيمات المعزولة أو المنقاة جزئياً هي أكثر المحفزات الحيوية دراسة فيما يتعلق بالتثبيت (تقييد الحركة). كما تجد هذه الأنزيمات المنقاة والمثبتة تطبيقات مناسبة في تطوير حساسات بيولوجية (Biosensors) وتحضير مواد ذات قيمة مضافة عالية، كالمركبات عديمة التناظر المرآتي (Chiral compounds). بالإضافة إلى استخدام الأشكال الأكثر بدائية منها في تطبيقات على مستوى ضخم من صناعة الكربوهيدرات والطعام والدواء.

تمتلك النظم ذات الأنزيمات المتعددة، كالعُضَيَات، أو الخلايا الكاملة أو الأنسجة الخلوية بعض الميزات الواضحة التي تميزها من الأنزيمات المعزولة.

إن الارتباط المتشكل بين الأنزيم والـــ Glutaraldehyde غير منعكس ويتحمل قيماً متطرفة من الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة، ما يشير إلى استقرار رابطة الألدامين (Aldamine) (القائمة بين مجموعة الـــ Aldehyde والـــ Amine).

يعتمد تشابك المحفز الحيوي مع الـــ Glutaraldehyde بشكلٍ حاسم على التوازن الدقيق بين عوامل مثل تركيز المحفز الحيوي وكل من كاشف التشابك، والرقم الهيدروجيني (Ph) والقوة الأيونية (Ionic strength) للمحلول المائي، ودرجة الحرارة وزمن التفاعل. إن الميزة الأكثر أهمية في هذه الطريقة هي الحاجة إلى كاشف واحد فقط حيث يكون من السهل إجراء التفاعل. غالباً ما يقود تثبيت المحفز الحيوي على حامل إلى فقد الفعاليته الأصلية (الطبيعية) (Native activity)، إلى جانب أن قسماً ضخماً، حوالى 90 إلى 99%، من كتلة الدعم الصلبة المستخدمة كحامل تكون خالية من أية فعالية حيوية، مما يقود إلى عطاء أقل في الحيز الفراغي المتاح في زمن محدد(Lower space-time yield) وإلى إنتاجية أقل. إلا أن استخدام أنزيمات مثبتة من غيرالحامل(Carrier- free immobilized enzymes) يؤمن مقاربة مناسبة للتغلب على مثل هذه العوائق، مع المحافظة على ميزات تثبيت المحفز الحيوي. يتم تحضير هذه الأنزيمات المثبتة من دون حوامل بواسطة تشبيك مباشر لمستحضرات الأنزيم التي يمكن أن تكون على شكل تكتلات، أو أنزيمات متبلورة أو منحلة أو أنزيمات مجففة بالترذيذ (بالبخ) (Spray-dried enzymes). وبذلك يتم الحصول من طرائق التشبيك المتنوعة هذه على: *تكتلات أنزيم مشبوكة* (Cross-linked enzyme aggregates (Cleas))، *بلورات أنزيم مشبوكة* (Cross-linked enzyme crystals (Clecs))، *أنزيمات مشبوكة* (Cross-linked enzymes (Cles))، *وأنزيمات مجففة بالترذيذ مشبوكة* (Cross-inked spray-dried enzymes (Csdes)).

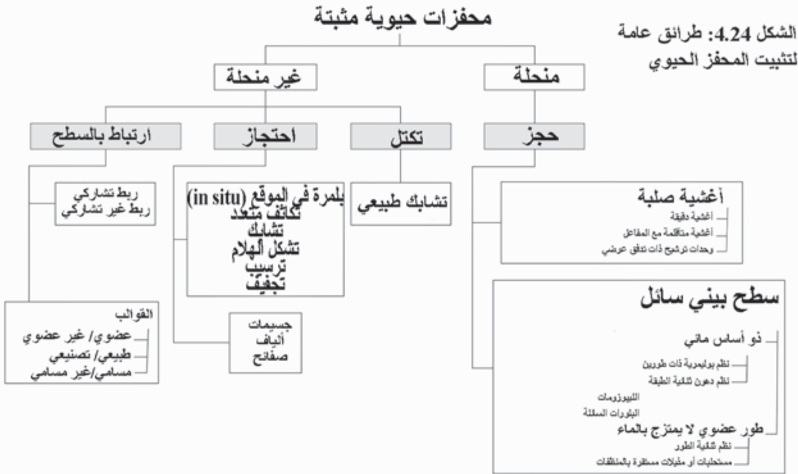
تبدي الأنزيمات المثبتة من دون حوامل بشكل عام فعاليات حجمية محددة أكبر بـــ 10−1000 مرة من مثيلاتها المثبتة المرتبطة بحامل (Carrier-bound). كما أنها مستقرة جداً في الظروف غير الطبيعية، كالتسخين والمحاليل

المنتج	- التقليل من أي تحول زائد للمنتج
المحدوديات	
زيادة تكاليف إنتاج المحفز الحيوي	احتياجات زائدة للمواد والتجهيزات الحاجة إلى شكل محدد للمفاعل
فقدان فعالية المحفز الحيوي أثناء عملية تثبيته	
متعلقة بالمحفز الحيوي	- التعرض لقيم متطرفة من الرقم الهيدروجيني ph ودرجات الحرارة - التعرض لمواد تفاعل سامة - التعرض لقوى جزٍّ عالية أو إجهاد ميكانيكي
متعلقة بالبيئة الدقيقة	- استبعاد الجزيئات الضخمة من المركبات الأولية - حجز الموقع الفعال للمحفز الحيوي - تغير موضعي في الرقم الهيدروجيني - محدودية نقل الكتلة
فقدان فعالية المحفز الحيوي خلال تشغيل المفاعل	
تسرب المحفز الحيوي	- تآكل القالب أو انحلاله - انتقال جسيمات صغيرة داعمة مع الدفق - نمو الخلايا داخل القالب - المجال الواسع لحجم المسمات
تسمم القالب أو فساده	- تراكم المثبطات في البيئة الدقيقة - استبقاء العوالق الصلبة - نمو أنواع من الكائنات الملوِّثة (أغشية حيوية) - الحاجة إلى ضبط أدق لمكونات المادة المغذية
الطبيعة التجريبية	- الحاجة في كل حالة إلى أمثلة ذات معايير متعددة - صعوبة نمذجة العملية وضبطها

2.3.24 طرق تثبيت المحفزات الحيوية

Methodes for biocatalyst immobilization

لقد تم تناول طيف واسع من إجراءات التثبيت للمحفزات الحيوية مع اختلافاتها الخاصة في عدد كبير من المقالات النقدية. كما تم أيضاً اقتراح عدة مخططات تصنيفية، أحدها مبين في الشكل 4.24.

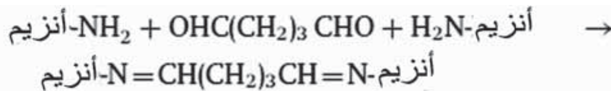


الشكل 4.24: طرائق عامة لتثبيت المحفز الحيوي

التشبيك بكواشف ثنائية الوظيفة

Cross – linking with bifunctional reagents

يمكن تشبيك (Cross-linking) كلٍّ من الخلايا والأنزيمات تشاركياً بكواشف ثنائية أو متعددة الوظائف(Bi-/multi-functional reagents)، كالألدهيدات (Aldehydes) والأمينات (Amines). إلا أن سمّية هذه الكواشف تجعل استخدامها يقتصر على تثبيت الخلايا غير الحية والأنزيمات. تنتج هذه الطريقة تكتلات(تجمعات) أنزيمية ثلاثية الأبعاد، متشابكة وبذلك غير منحلة في الماء. إن الغلوتارالديهايد (Glutaraldehyde) هوالكاشف الأكثر استخداماً في التشبيك، وهو يتفاعل مع ثمالات الليزيل (Lysyl) في الأنزيم مشكلاً قاعدة Schiff:



$$\text{أنزيم}\text{-}NH_2 + OHC(CH_2)_3CHO + H_2N\text{-}\text{أنزيم} \rightarrow \text{أنزيم}\text{-}N{=}CH(CH_2)_3CH{=}N\text{-}\text{أنزيم}$$

إن الارتباط المتشكل بين الأنزيم والــ Glutaraldehyde غير منعكس ويتحمل قيماً متطرفة من الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة، ما يشير إلى استقرار رابطة الألدامين (Aldamine) (القائمة بين مجموعة الــ Aldehyde والــ Amine).

يعتمد تشابك المحفز الحيوي مع الــ Glutaraldehyde بشكلٍ حاسم على التوازن الدقيق بين عوامل مثل تركيز المحفز الحيوي وكل من كاشف التشابك، والرقم الهيدروجيني (Ph) والقوة الأيونية (Ionic strength) للمحلول المائي، ودرجة الحرارة وزمن التفاعل. إن الميزة الأكثر أهمية في هذه الطريقة هي الحاجة إلى كاشف واحد فقط حيث يكون من السهل إجراء التفاعل. غالباً ما يقود تثبيت المحفز الحيوي على حامل إلى فقد الفعاليته الأصلية (الطبيعية) (Native activity)، إلى جانب أن قسماً ضخماً، حوالى 90 إلى 99%، من كتلة الدعم الصلبة المستخدمة كحامل تكون خالية من أية فعالية حيوية، مما يقود إلى عطاء أقل في الحيز الفراغي المتاح في زمن محدد(Lower space-time yield) وإلى إنتاجية أقل. إلا أن استخدام أنزيمات مثبتة من غيرالحامل(Carrier- free immobilized enzymes) يؤمن مقاربة مناسبة للتغلب على مثل هذه العوائق، مع المحافظة على ميزات تثبيت المحفز الحيوي. يتم تحضير هذه الأنزيمات المثبتة من دون حوامل بواسطة تشبيك مباشر لمستحضرات الأنزيم التي يمكن أن تكون على شكل تكتلات، أو أنزيمات متبلورة أو منحلة أو أنزيمات مجففة بالترذيذ (بالبخ) (Spray-dried enzymes). وبذلك يتم الحصول من طرائق التشبيك المتنوعة هذه على: *تكتلات أنزيم مشبوكة* (Cross-linked enzyme aggregates (Cleas))، *بلورات أنزيم مشبوكة* (Cross-linked enzyme crystals (Clecs))، *أنزيمات مشبوكة* (Cross-linked enzymes (Cles))، *وأنزيمات مجففة بالترذيذ مشبوكة* (Cross-lnked spray-dried enzymes (Csdes)).

تبدي الأنزيمات المثبتة من دون حوامل بشكل عام فعاليات حجمية محددة أكبر بــ 10–1000 مرة من مثيلاتها المثبتة المرتبطة بحامل (Carrier-bound). كما أنها مستقرة جداً في الظروف غير الطبيعية، كالتسخين والمحاليل

العضوية. يتضمن تطبيق هذه المقاربة تثبيت أنزيمات أميداز (Amidase) البينيسيلين G، والثيرمولايزين (Thermolysin)، والاستيراز (Esterase)، والأسبارجيناز (Asparaginase)، والليباز (Lipase)، الليزوزايم (Lysozyme)، والغلوكوأميلاز (Glucoamylase)، واليورياز (Urease) في هيئة بلورات أنزيم مشبوكة (Clecs)، والتريبسين (Trypsin) ، والبابباين (Papain) في هيئة أنزيمات مشبوكة (Cles)، وأسيلاز (Acylase) البينيسيلين في هيئة تكتلات أنزيم مشبوكة (CLEA).

طرائق التثبيت المدعّمة Supported immobilization methods

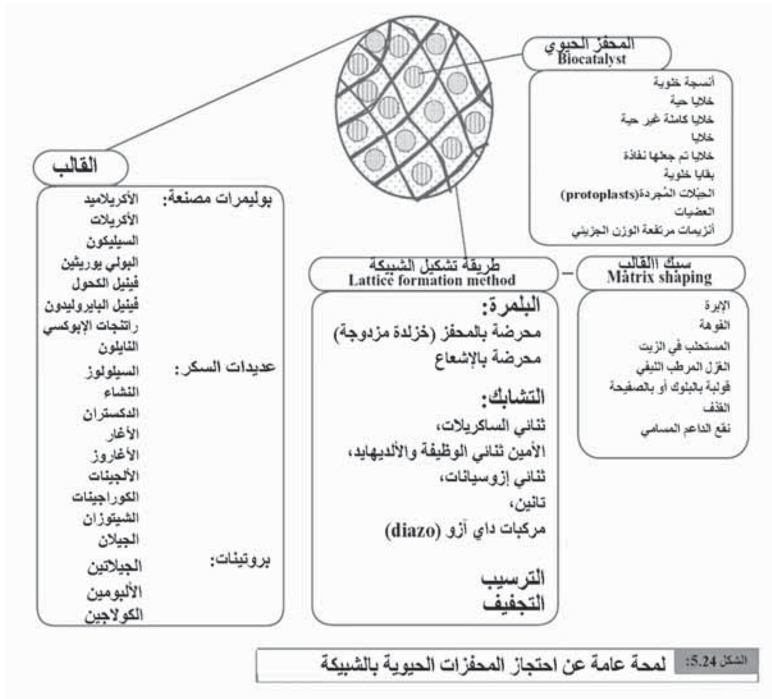
تقع الطرائق المتوفرة لتثبيت المحفزات الحيوية بواسطة الدعائم في فئتين إجماليتين: فئة *الارتباط بالسطح* (*Surface attachment*) وفئة *الاحتجاز بالشبيكة* (*Lattice entrapment*). في حالة الارتباط بالسطح، يتم ربط الأنزيم، أو العضيّ أو الخلية بسطح بيني صلب عبر التفاعل المتبادل الذي يتراوح بين قوى Van Der Waal الضعيفة والربط التشاركي غير المنعكس. إن التفاعلات المتبادلة الأكثر اعتدالاً يمكن أن تنتج من الاتصال المباشر، في ظروفٍ ملائمة، بين المحفز الحيوي والسطح الطبيعي غير المعدل. لكن تنوع وفعالية سطح التثبيت قد ازدادت كثيراً مع إدخال حوامل مصنعة وتعديلات كيميائية على القوالب الطبيعية والاصطناعية. أما في حالة الاحتجاز بالشبيكة، فإنه يتم إحداث عملية تصليب (Solidification) كيميائية أو فيزيائية في محلول يحتوي على المحفز الحيوي، ما ينتج منها في الحالة المثالية شبكة غير منحلة في الماء تحتجز المحفز الحيوي في شكله الفعال أو الحي. كما أنه من الممكن في هذا النوع من الإجراءات، توظيف آليات مثل البلمرة (Polymerization)، أو تشكيل الهلام حرارياً أو الترسيب. يقدم الشكلين 5.24 و6.24 نظرة عامة عن المحفزات الحيوية، والدعائم وطرق الاستبقاء المستخدمِين في حالات التثبيت عن طريق الارتباط بالسطح والاحتجاز.

دعائم لتثبيت المحفز الحيوي

Supports for biocatalyst immobilization

إن التطوير المفيد لمحفز حيوي مثبت بداعم يتضمن بالضرورة اختيار داعم صلب. مثالياً، يجب أن تكون خطوة الاختيار هذه قائمة على بيانات مؤكدة لبنية وفعالية المحفز الحيوي وطريقة التثبيت العامة التي ستُستخدم، وعلى شروط العملية أيضاً. تتلخص العوامل الهامة لفحص نطاق واسع من الدعائم الممكنة في الجدولين 3.24 و4.24. ولأنه يجب الأخذ بالاعتبار عدة عوامل في العادة عند القيام بتثبيت المحفز الحيوي في العملية، فإنه يتم تسوية المحلول الأفضل على نحو متواتر. وباعتبار هذا، يُستخدم في أغلب الأحيان داعم ذو طبعٍ مرن أكثر. على سبيل المثال، يستطيع الداعم المسامي (Porous support) أن يثبت مقداراً كبيراً من المحفز الحيوي؛ ولكن، لتجنب المحدوديات بانتشار المحفز الحيوي، يجب استخدام هذا الداعم على شكل جزيئات صغيرة جداً (انظر الفقرة 3.24).

أما في الحالات الأخرى، فهناك عوامل قليلة جداً هي التي تحدد اختيار الداعم، كما في حالة النظم التي تهدف إلى حفظ الفعالية التحفيزية الحيوية بوجود مكونات مؤذية في وسط التفاعل، كفصائل من الكائنات السامة، أو مذيبات عضوية أو مثبطات قوية. في هذه النظم، تكون القوالب المسامية التي تحتجز المحفز الحيوي وتستثني المثبط في أغلب الأحيان هي الخيار الوحيد الفعال، بغضّ النظر عن معوقات الانتشار التي تبطئ التفاعل. كما يمكن لتغيير شكل، أو مسامية أو صفة الكره (الطرد) للماء (Hydrophobcity) لدى الداعم هنا أن تكون مفيدة عند استخدام مركبات أولية مضبوطة الدقة (Fine-tuning substrate) أو تستثني أحجام المركبات غير المركب الأولي وذات معدلات انتقال باطني وظاهري للكتلة.



الشكل 5.24: لمحة عامة عن احتجاز المحفزات الحيوية بالشبيكة



الشكل 24-6: لمحة عامة عن احتجاز المحفزات الحيوية بالشبيكة

الجدول 3.24: الأوجه الهامة في الطبيعة الكيميائية للدعائم المستخدمة في تثبيت المحفز الحيوي

	الطبيعة الكيميائية/ الأصل[أ]			
	عضوية		غير عضوية	
	طبيعية	مصنّعة	معدنية	إصطناعية
توفر المجموعات الوظيفية التفاعلية قابلية استخدامها مع مجموعة متنوعة من المحفزات الحيوية	++	+++	+	+
مدى واسع من التقنيات لتفعيل السطح	++	+++	+	+
دعائم مفعّلة مسبقاً متوفرة تجارياً	+++	++	−	+
قابلية استخدامها مع تقنيات تشكيل الشبيكة	+++	+++	−	−
إمكانية التحكم بخاصية الحب وكره (طرد) الماء	+	+++	+	+
الحساسية تجاه العوامل الفيزيائية والكيميائية والجرثومية مقاومتها للتغيرات في مكونات وسط التفاعل (pH، القوة الأيونية الأوساط العضوية)	+	++	+++	+++
مقاومتها لدرجات الحرارة المرتفعة	−	+	+++	+++
مقاومتها للضغط العالي الهيدروستاتي (توازن المائع) والهيدروديناميكي	−	++	+++	+++
قابلية تجددها	−	+	+++	++
كلفتها المنخفضة/ توفرها	+++	+	+++	+
قابلية الحصول على تشكل (مورفولوجيا) الداعم القطر المستخدم أو مدى السماكة	++	+++	+	+++

مدى المسامية المتوفرة	+	++	++	++
قابلية الحصول على الأشكال				
كرة	++	++	–	+++
نسيج	++	+++	–	+++
صفيحة/ غشاء	++	+++	–	+++

(أ) –، غير كافٍ؛ +، ضعيف؛ ++، معتدل؛ +++، جيد.

إن البوليمرات العضوية هي أكثر الدعائم الموظفة بشكلٍ واسع من أجل تثبيت المحفز الحيوي (للأمثلة، انظر الشكلين 5.24 و6.24). ويعود هذا التفضيل إلى تأقلم هذه الدعائم تقريباً مع جميع أنواع تقنيات الربط بالسطح (Surface-binding) أو الاحتجاز (Entrapment) ومع تشكيلة واسعة من مواصفاتها الكيميائية والفيزيائية. أما العوائق الرئيسية في استخدام البوليمرات العضوية، فتتأتّى من المقاومة الكيميائية والميكانيكية غير الكافية، التي تحد من استخدامها في ظروف أكثر قساوة ومن إمكانية تجديدها (Regeneration).

الادمصاص والربط الأيوني Adsorption and ionic binding

إن الادمصاص (Adsorption) على السطح هو أقدم وأبسط طريقة لاستبقاء المحفزات الحيوية، فهي لا تتضمن تعديلات مسبقة على السطح الصلب، إنما تعتمد على تفاعلات متبادلة ضعيفة من أنواع كهروستاتيكية فاندرفال van der waal، Electrostatic (أيونية)، الكارهة للماء أو الرابطة الهيدروجينية. وهذا الإجراء هو قليل الكلفة، وغالباً ما يستبقي على الشكل الطبيعي للأنزيم المثبت وعلى فعاليته التحفيزية الذاتية. إلا أن التطبيق العام لطرائق الادمصاص الفيزيائية هي شديدة المحدودية بسبب الربط المنعكس بين المحفز الحيوي والداعم، الذي يعتمد بدقة على شروط العملية، كالحرارة، والرقم الهيدروجيني (pH)، والقوة الأيونية (Ionic strength) وثابت عزل الكهرباء (Dielectric constant). لذلك، مع هذه المحدودية فإنه من الصعب استخدام طريقة التثبيت بالادمصاص لتشغيل مفاعلات حيوية على مستوى ضخم من غير أن يكون هناك تسرب هام

للمحفز الحيوي، والذي ينتهي إلى خسارة في الإنتاجية وتلويث المنتج. من ناحية أخرى، تتيح هذه الطريقة تجديد الدعائم مباشرةً. وبعد الادمصاص، من الممكن أن يتشابك الأنزيم ؛ إلا أن هذا يحد من امكانية إعادة استخدام الداعم.

الجدول 4.24: الأوجه الهامة في تشكل (مورفولوجيا) الدعائم المستخدمة في تثبيت المحفز الحيوي

	مورفولوجيا[أ]	
المواصفات	**مسامية**	**غير مسامية**
مساحة السطح الإجمالية المتوفرة لكل لكل وحدة وزن	+++	+
قلة حدوث مقيِّدات الانتشار	+	+++
إمكانية تحميل (إدخال) المحفز الحيوي	+++	+
حماية المحفز الحيوي من العدوانات الخارجية	++	+
قابلية استخدامها مع مركبات أولية ضخمة الجزيء	+	+++

	اصطناعية			
	معدنية	**غير عضوية**	**هلام**	
توحد حجم الثقب	+	+++	++	غير متوفرة
ثباتية حجم الثقب	++	+++	+	غير متوفرة
الكلفة المنخفضة	+++	–	+++	+++

(أ) –، غير كافٍ؛ +، ضعيف؛ ++، معتدل؛ +++، جيد.

إن الحقل المتنامي لاستعمال الأنزيمات المدمصة فيزيائياً هو التحفيز الحيوي في سوائل غير مائية. وباستخدام مذيب عضوي بحيث يكون الأنزيم فيه غير منحل، فإن الأنزيم المربوط من خلال الادمصاص البسيط بالحامل لن يكون مدمصاً فعلياً في العمليات المطولة. لقد تم ادمصاص أنزيم الليباز (Lipase) المأخوذ من فطر *Rhizomucor miehei* على داعم من بولي الأكريلات (Polyacrylate) مع فعالية استبقاء عالية (90%) كما استُخدم في تفاعلات التحلل المائي (Hydrolytic) والتفاعلات التصنيعية (Synthetic reactions). والمثال على استخدام الأنزيمات

المدمصة في الصناعة يتجلى في أنزيم الــLipase من فطر الــ *Rhizopus* المدمص على مادة الــCelite من أجل إنتاج مستمر لدهون شبيهة بزبدة الكاكاو في أوساط عضوية. أما التطبيقات الأخرى فتضم تثبيت الكزايلاناز (Xylanase) على مادة الــEudragit L-100 لتحطيم الكزايلان (Xylan) أو تثبيت الكتالاز(Catalase) على أغشية صفيحية مسطحة مكونة من الــ pHEMA ((Poly(2-hydroxyethylmethacrylate)، أو ادمصاص أنزيمات الــlipase على حبيبات Sepa (Sepabeads) لاستخدامها في تفاعلات التحليل المائي (Hydrolysis)، أو أكسدة الريسفيراتول (Resveratol) بواسطة أنزيم اللاكاز (Laccase) المدمص على حبيبات زجاجية، أو ادمصاص أنزيمات السبليزين (Subilisin) والكيموتريبسين (Chemotrypsin) على هلام السيليكا (Silica) كروماتوغرافي قياسي مما يؤدي إلى تعزيز الفعالية التحفيزية حتى ألف مرة تجاه نيتريل الخل (Acetonitril) ورباعي الهيدروفوران (Tetrahydrofuran) مقارنةً بأشكالها المتتابعة من المساحيق الأنزيمية المجففة بالتجميد Freez dried enzyme) .powders)

من الممكن تحقيق ارتباط أقوى بقليل بين المحفز الحيوي والداعم (Biocatalyst- support linkage) من خلال الدعائم الأيونية. إن ميزات ومحدوديات هذا النوع من الارتباط هي تقريباً ذاتها كما في الادمصاص الفيزيائي، حيث إن ثباتية الروابط الأيونية هي حساسة بشكل خاص للرقم الهيدروجيني Ph والقوة الأيونية. لقد تم ادمصاص أنزيم ايزوميراز الغلوكوز (Glucose isomerase) من بكتيريا *Streptomyces rubiginous* على راتنجة تبادل أيونية سالبة الشحنة (Anion-exchange resin) تتألف من DEAE– السيليوز المتكتلة مع البوليستيرين (Polystyrene) وثاني أوكسيد التيتانيوم (Tio_2). كما تم تنفيذ هذه العملية صناعياً وذلك لمصاوغة (تزامر) الغلوكوز إلى الفروكتوز. والأمثلة الأخرى في هذا المجال تضم تثبيت أنزيم بيتا–غلاكتوزيداز (β-galactosidase) على راتنجة تبادل أيونية سالبة الشحنة، القائمة على أساس تغشي الأسطح الداخلية للحبيبات التجارية (حبيبات Sepa) ببولي إثيلينيمين ((Polyethelenimine (PEI)، حيث جرى بعد ذلك استخدام هذا المستحضر لتحليل اللاكتوز. وعلى نحوٍ مشابه، فقد تم

تثبيت أنزيم الكيراتيناز (Keratinase) على دعائم الــDowex وDEAE–السيلولوز لتحليل (Hydrolyse) مختلف المركبات الشبيهة بالبروتينات.

اقتران الأنزيمات تشاركياً (تساهمياً)

Covalent coupling of enzymes

ربما تتضمن مقاربة تثبيت الأنزيم الأكثر استكشافاً ربطاً تشاركياً (Covalent binding) لثمالات الأحماض الأمينية في البروتين بمجموعات تفاعلية في الداعم. من حيث المبدأ، يؤدي التنوع الواسع في تفعيل السطح وتوفر تفاعلات الاقتران إلى جعل هذه المقاربة طريقة قابلة للتطبيق. غير أن كلفة المواد المرتفعة، والإجراءات المعقدة في الغالب وخسارة جزء من الفعالية التحفيزية التي لا مفر منها تقريباً، هي كلها عوائق تجعل التطبيقات العملية للتثبيت التشاركي بالسطح مقتصرة على حالات خاصة ذات ميزات بارزة.

ينتج من الاقتران التشاركي للأنزيمات بالدعائم، متحِدات عالية الثباتية مع عدم وجود ارتشاح بروتيني على مدى واسع من شروط التشغيل. لقد أعطت كل من أنزيمات التريبسين (Trypsin) واسيلاز (Acylase) البينيسيلين والــLipases المثبتة من خلال عدة نقاط بارتباط تشاركي (Multiple-point covalent attachment) على الأغاروز المفعل بالــCNBr، مشتقات مستقرة أكثر بكثير (300–50000 مرة) من نظيراتها الحرة. إذ كانت حصيلة التعليق التشاركي بأكثر من نقطة لأنزيم الكاربوكسيبيبتيداز A (Carboxypeptidase A) على هلام الأغاروز المحتوي على الــAldehyde، ألف مرة ثباتية معززة. مثالياً، يجب ألا يتدخل تفاعل الربط بثمالات الأحماض الأمينية في الموقع الفعال (Active site) من الأنزيم، كما يجب ألّا يشوِّه شكل البروتين الطبيعي أو أن يغير في مرونة الأنزيم كنتيجةٍ للارتباط على مستوى نقطة واحدة أو عدة نقاط. لتحقيق هذه المتطلبات، هناك طرائق تضم خطوات تفعيل متعددة المراحل. وبالرغم من أنه بالامكان، مبدئياً، استخدام عشر ثمالات مختلفة من الأحماض الأمينية في الأنزيم

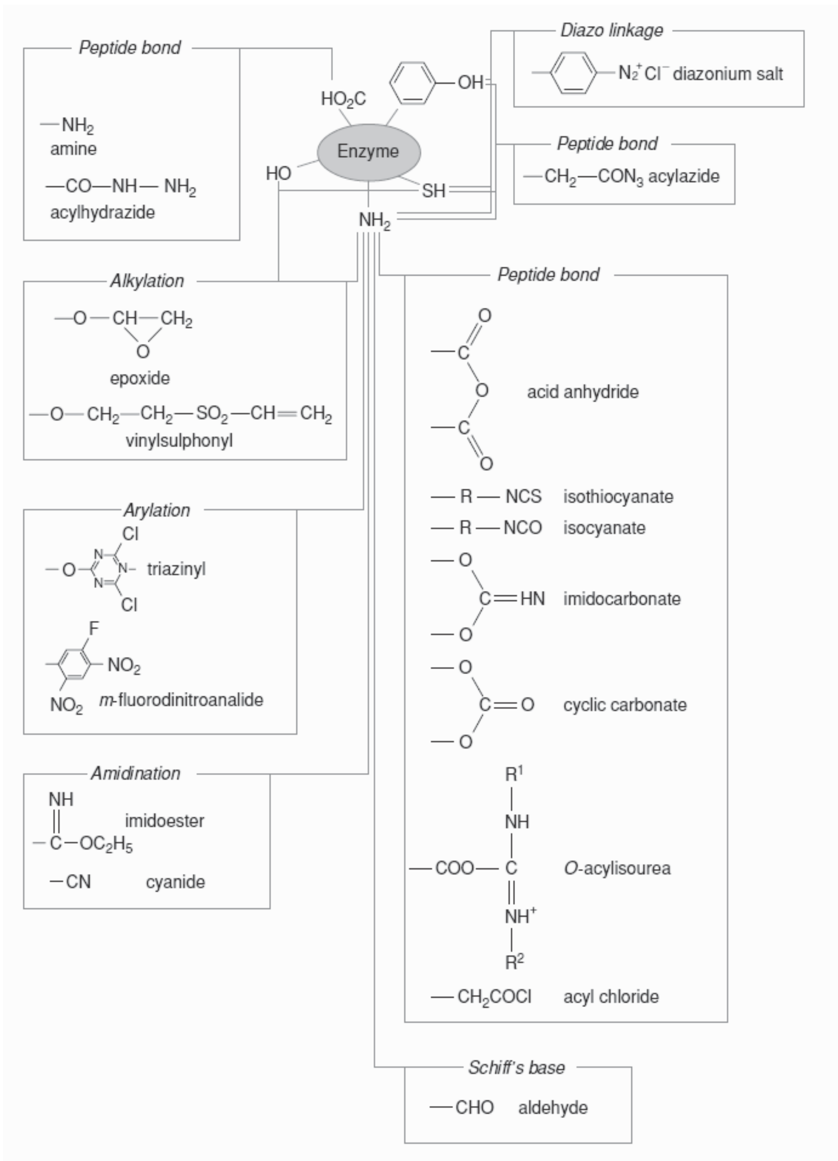
لإنشاء الاقتران التشاركي، إلا أن معظم العمليات تستهدف مجموعات الأمينو (Amino)، الثايول (Thiol)، الفينوليك (Phenolic) والهيدروكسيل (Hydroxyl). إن بعض تفاعلات الاقتران الأساسية هي مقدمة في الشكل 7.24.

مؤخراً، لقد أعطى التعليق التشاركي المتعدد النقاط (Multiple-point covalent attachment) لأنزيم اسيلاز البينيسيلينG (Penicillin G acylase) على الهلامات الجافة (Xerogels) المعدلة عضوياً محفِّزاً حيوياً ذا فعالية خاصة جداً وثباتية حرارية. تم تحضير هذه *الهلامات الجافة* عن طريق عمليات مصاحبة من تحلل (Co-hydrolysis) وتكثف (Co-condensation) الألكوكسيدات (Alkoxides) المفعلة بمجموعة عضوية منتقاة من أجل مجاراة متطلبات الأنزيم. كما استُخدمت أيضاً *حبيبات Sepa*، وهي دعائم تعتمد على الإيبوكسي (Epoxy-based supports)، من أجل تعليق أنزيم بيتا−غلاكتوزيداز من خلال عدة نقاط (انظر أعلاه). إن الإنجاز الذي تحقق وهو اقتران الأنزِّيمات (مثلاً بيتا− فروكتوزيداز (β-fructosidase))، أسيلاز الـــ GL-7-ACA ونازعة هيدروجين اللاكتات (Lactate dehydrogenase)) تشاركياً بالدعائم المعدلة من خلال تغشيتها بالـــ-3) aminopropyl) triethoxysilane، أي من خلال عملية الـــSilanisation، والمفعلة بألديهايد الغلوتاريل (Glutarylaldehyde) كان كوسيلة لتطوير حساسات اللاكتات والسوكروز الحيوية أو لإنتاج حمض السيفالوسبورانيك (7-ACA). فقد تم تثيت أنزيم أسيلاز البينيسيلين G تشاركياً على الهلامات الجافة المعدلة عضوياً، لإعطاء محفزات حيوية ذات فعالية خاصة جداً وثباتية حرارية. كما أن الحامل، Eupergit C، المكوّن من حبيبات كبيرة المسامات ذات قطر يتراوح بين-100 250µm ومصنوعة بواسطة بلمرة متصاحبة(Co-polmerization) للـــN,N-methelene-bis-methacrylamide، والـــGlycidyl methacrylate، والـــ Allyl glycidyl ether والـــMethacrylamide، جرى استخدامه (أي الحامل) كثيراً من أجل تثبيت الأنزيمات، وهي، أنزيم Pepsin، وTrysin، وPhosphadiesterase، وLipase، وGlocoseoxidase، وGlycolate، وAxidase، وCytidine Deaminase وPenicillin Acylase تشاركياً. إضافة

إلى ذلك، تم ربط أزيم أوكسيداز الغلوكوز (Glucose oxidase) تشاركياً بتركيبة كربونية مصنعة من خلال عملية الــ sol-gel لتطوير حساس الغلوكوز، وأيضاً أنزيم البيبسين (Pepsin) بجسيمات نانونية من الذهب (Gold nanoparticles) مرتبطة بالــ APTS (3-aminopropyltrimethoxysilane) على مدى سطح الادمصاصات من الزيولايت (Zeolites) المفعلة (Functionalized) مما أدى إلى إعطاء محفز حيوي ذي فعالية نوعية جداً ورقم هيدروجيني معزز وثباتية حرارية أفضل مقارنة بالشكل الحر لهذا الأنزيم.

الاحتجاز بالشبيكة Lattice entrapment

يهدف تثبيت المحفزات الحيوية داخل شبكات القوالب الصلبة إلى استغلال فرق الحجم بين المركب الأولي، أو المنتج والمحفز الحيوي، وذلك من أجل استبقاء الأخير (المحفز) بشكل كامل، بينما يبقى الأول (المركب الأولي أو المنتج) يتحرك بحرية بين الوسط والموقع التحفيزي للأنزيم(Catalytic site). بشكلٍ عام، في حالة الاحتجاز بالشبيكة، لا يتعرض المحفز الحيوي إلى قوى ربط قوية؛ فليس هناك من تحوير لبنية الأنزيم أو حجز للموقع الفعال. إلا أنه يمكن أن يحصل بعض التعطيل لفعالية الأنزيم خلال عملية التثبيت بسبب تغير قيمة الرقم الهيدروجيني(pH) والحرارة عند وجود مونومرات أو مذيبات عادائية. يجري تشكيل القوالب بوجود المحفز الحيوي وذلك من خلال عملية البلمرة في الموقع (In Situ) ابتداءاً بالبوليمرات الملائمة، أو من خلال تصليب (Solidify) محاليل البوليمر عبر تشبيك أيوني (الألجينات Alginates) و تشاركي (Chitosan، كحول الــ Polyvinyl، Polyurethanes)، أو من خلال التبريد (الأغاروز، الجيلاتين)، أو التجفيف أو تحريض الترسب (الكارّاجينان Carrageenan) (الشكل 8.24)، حيث إن المعايير الدقيقة في مثل هذه العمليات تتعلق دائماً بأمثلة حجم الثقب وبتأثيره في صلابة الداعم وفي انتشار (Diffusion) المركب الأولي داخل الشبيكة.



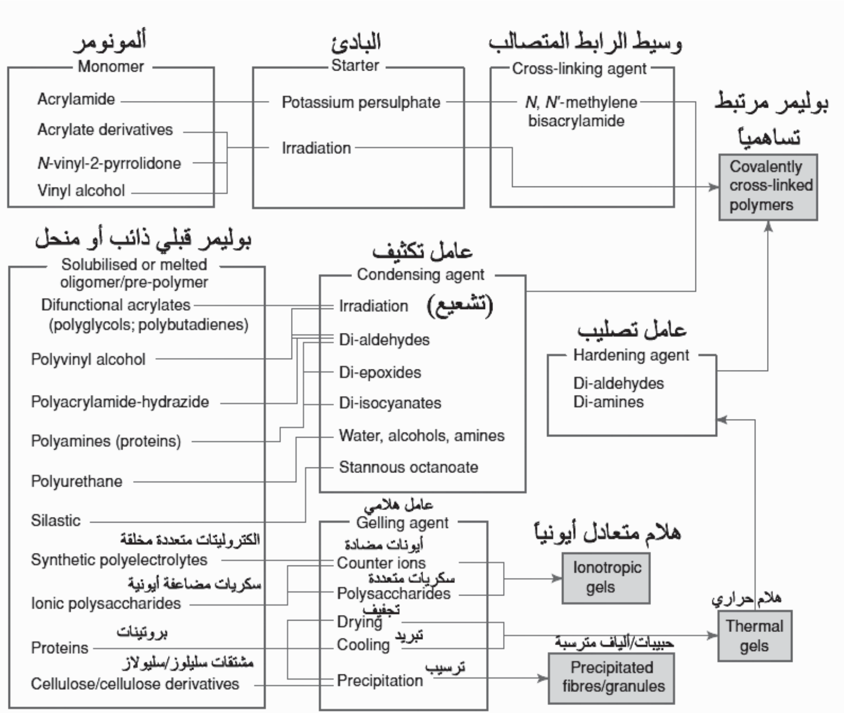
الشكل 7.24: أمثلة على اقتران الأنزيمات التشاركي بالمجوعات الفعالة على الداعم

رابطة ببتيدية:Peptide bond

أمين amine، أسيل هايدرازيد acylhydrazide

ألكلة Alkylation: إيبوكسيد epoxide، فينيل سلفونيل vinylsulphony

ارتباط داي آزو (diazo): ملح ثنائي الآزونيوم N2 Cl -diazonium salt



الشكل 8.24: أمثلة على استراتيجيات تشكيل الشبيكة لاحتجاز المحفزات الحيوية.

هناك عدة محاولات تم القيام بها لاحتجاز الأنزيمات المعزولة؛ ولكن بسبب ارتشاح الأنزيم، فإن طريقة التثبيت هذه تستخدَم بشكل رئيسي في تثبيت الخلايا الكاملة. والأمثلة التي تضم استخدام الخلايا المحتجزة في الصناعة لإنتاج الأحماض الأمينية (L-Isoleucin،L-Aspartic Acid)، وحمض الماليك (Malic acid)، والهيدروكينون (Hydroquinone) والأكريلاميد (Acrylamide) هي عدة. أما الأمثلة الأخرى على الأنزيمات المحتجزة فتضم: أنزيم إستيراز (Esterase) كبد الخنزير المحتجز في ألجينات الكالسيوم وهلام البولي أكريلاميد من أجل قطع أوفلوكساسين بيوتيل الإستر (Ofloxacin butyl ester) بانتقائية مصاوغة مرآتية (Enontioselective) وإعطاء الليفوفلوسين (Levofloacin)، وأنزيمات الغلوكو أميلاز (Glucoamylase) والبولولاناز (Pollulanalase) المحتجزة في حبيبات (Beads) الألجينات لتحليل النشاء. وللتقليص من ارتشاح الأنزيم فإنه يتم تشبيكه قبيل احتجازه بالغلوتاريل ألديهايد (Glutarylaldehyde) الذي يُستخدم أيضاً

في معالجة الحبيبات من أجل تقويتها. وبالبرغم من أن هذه المعالجة قد تؤدي إلى تخفيض الفعالية غير أنها تؤمن زمن فعالية أطول للمحفز.

إن المقاربة الأكثر جذرية لإنتاج حفازات حيوية محتجزة فعالة هي قائمة على استخدام تركيبات الــ Sol-Gel. وهي زجاجات أوكسيد يمكن انتاجها تحت شروط بلمرة معتدلة ومع خاصية كره (طرد) للماء مضبوطة، مما يعطي جسيمات يمكن تصنيعها بأشكال متنوعة ذات فعالية تحفيز حيوي وثباتية كيميائية وميكانيكية عالية. إضافة إلى ذلك، لقد تم احتجاز المحفز الحيوي فيزيائياً في إطار زجاجي قاسٍ بحيث يؤمن قالباً من التفاعلات المتبادلة التي تزيد من استقرارية المحفز وتبطل فعلياً الترشح الأنزيمي. كما أن الدرجة العالية لصلابة الجزيء الحيوي تخفض أيضاً من تعطيل (Deactivation) الحفاز الحيوي. هذه المقاربة جرى استخدامها في نظم متنوعة وكثيرة، تحديداً في عمليات الأسترة (Esterificaton) والتصنيع (Synthesis) التي تتضمن استخدام الليباز (Lipase) أو في عمليات السلفدة (Sulphoidation) بواسط أنزيم بيروكسيداز الجرجار (Horse radish peroxidase) وفي تطوير الحساسات الحيوية (Biosensors).

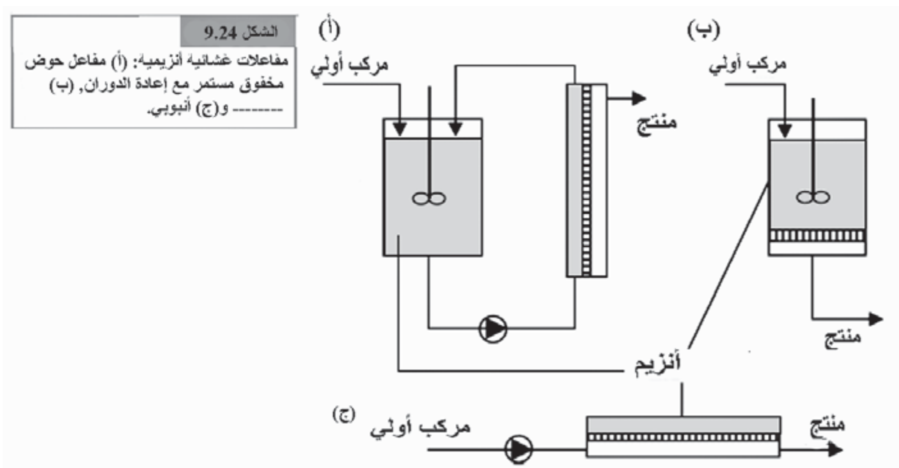
كما جرى أيضاً تقييم السيليكا كأداة فعالة لتثبيت أزيم بيوتيريل كولين الإستر (Butyrylcholinesterase). في هذه المقاربة يتم الحصول على جسيمات السيليكا النانونية (Nanparticles) الفعالة حيوياً عن طريق ترسيبها المُحفَّز بببتيد تكثيف السيليكا (Silica-condensing peptide) المضاف إلى محلول حمض السيليكا. وقد تبين أن مدة استبقاء فعالية الأنزيم وثباتيته خلال التخزين هي أعلى مقارنةً بالمقاربة التي تعتمد على عملية الــ sol-gel.

طرائق تثبيت الأنزيمات المنحلة والخلايا المعلقة

Immobilized soluble enzyme and suspended cell methods

إن جميع طرائق تثبيت المحفزات الحيوية (Biocatalysts immobilization) التي جرى وصفها حتى الآن تتضمن تعديلات على المحفز الحيوي (الأنزيم) وعلى بيئته الدقيقة (Microenvironment)، بالإضافة إلى

التعديلات اللاحقة على خصائصه الحركية (Kinetics) والتحفيزية (Catalytic). ومن أجل استخدام المحفز الحيوي بحالته الطبيعية على مدى وقتٍ طويل وعلى نحوٍ متواصل، فقد تم حصر المحفزات الحيوية داخل أغشية شبه نفاذة في شكل ألياف مجوفة (Hollow fibers) أو داخل مفاعلات ذات صفيحة مسطحة من غشاء الترشيح الفائق (Ultrafiltration membrane) (الشكل 9.24). وبذلك يُبقي الغشاء على المحفز الحيوي، بينما يكون مُنفِذاً للمنتجات، وفي بعض الأحيان للمركبات الأولية. تقدم هذه الطريقة عدة ميزات مقارنة بطرائق التثبيت الأخرى حيث إن التعديلات الكيميائية على المحفز الحيوي غير ضرورية، كما يظل المحفز الحيوي فيها مستبقياً على خصائصه الحركية.



الشكل 9.24
مفاعلات غشائيه أنزيميه: (أ) مفاعل حوض مخفوق مستمر مع إعادة الدوران, (ب) -------- و(ج) أنبوبي.

هذه الطريقة هي مناسبة بصورة خاصة لتحويل المركبات الأولية ذات الوزن الجزيئي(Molecular weight) الكبير أو غير المنحلة، كالنشاء، والسيلولوز والبروتينات، كما تسمح بتماس وثيق بين المحفز الحيوي والمركب الأولي (Substrate) مما يحقق تحولٍ فعال للمركبات الأولية. ولكن، هناك بعض العوائق المتأصلة في هذه الطريقة وهي: إمكانية الانخفاض في معدل التفاعل كنتيجة مقاومة الغشاء للنفاذية (Permeability)؛ وادمصاص (Adsorption) المحفز الحيوي و/أو المركب الأولي والمنتج على سطح الغشاء. لقد وجد هذا النوع من عمليات التثبيت تطبيقات في تعديل الدهون والزيوت (مثل زيت الزيتون وزيت النخيل) بواسط

أنزيمات اللبياز (Lipases) وفي تصنيع الببتيدات الثنائية (أسيتيل فينيل ألانين– اللوسياميد (Acetylphenylalanine-Leucinamide)) بواسطة أنزيمات البروتياز (Proteases) في أوساط عضوية. وتضم الأمثلة الحديثة الأخرى: الإنتاج المتواصل لــR-(-)-Phenylacetylcarbinol، الذي هو المركب الوسيط (Intermediate) الأساس في تصنيع الإفيدرين (Ephedrine) باستخدام ديكاربوكسيلاز البيروفات (Pyrovate decarboxilase)؛ تحليل البينيسيلين G باستخدام أسيلاز البينيسيلين (Penicillin acyelase)؛ تحويل حمض الفوماريك (Fumaric acid) إلى L– حمض الماليك (L-malic acid) بواسطة الفوماراز (Fumarase)؛ تحليل الزيلان (Xylan) المحفز بأنزيمات الزيلاناز (Xylanases).

تثبيت نظم متعددة الأنزيم وتثبيت الخلايا

Immobilization of multi enzyme systems and Cells

إن أحد المعوقات القوية في نظم الأنزيم الفردية، الحرة أو المثبتة، هي محدوديتها للتحول بالخطوة الواحدة (Singe-step tansformation). تكون هذه المحدودية شديدة التأثير في التحولات غير المرغوبة من ناحية الديناميكية الحرارية (Thermodnamic) وفي تلك التي تتطلب تجديد العوامل المساعدة (Co-factors) للأنزيم، كتفاعلات الخزلدة (Redox reactions) أو الفسفرة (Phsphorelation reactions). ومن ضمن الحلول الممكنة هو اقتران التفاعل الأنزيمي المقصود بتفاعلٍ كيميائي أو تفاعلٍ أنزيمي ثانٍ. لقد تم التقصي عن هذا البديل الأخير في عدة نظم ذات اعتماد على جزيئات الــNAD(P) أو الــ NAD(P), ATP-dependent) ATP systems)، باستخدام زوج من الأنزيمات وزوج من المركبات الأولية (Substrates)، بالإضافة إلى عوامل مساعدة تتردد فيما بينهم. وبذلك، عندما تُنَفذ عمليتين أو أكثر من التحولات الحيوية تزامنياً بنفس الوعاء – لتجدد العامل المساعد، أو لتحول (انزياح) التوزنات الدينميكية الحرارية (Thermodynamic equilibria)، أو لتأييد اقتصاديات العملية – فإنه يجب تحويل المنتجات الوسيطة بسرعة. في هذا السياق، من المحتمل لعملية تثبيت الأنزيمات المصاحبة (Co- immobilization) أن تخفف من ممرات انتشار المركبات الوسيطة

(Intermediates) بين المواقع الفعالة (Active sites)، وبذلك تسريع الخطوات المقيِّدة لمعدل التفاعل(Rate-lmiting steps). إلا أن هذه النظم تعاني مشاكل بالغة تتعلق بأخذ الموقع الصحيح من قبل الأنزيمات والعوامل المساعدة بالنسبة إلى بعضها البعض، والتي من الصعب جداً التوصل إليها عملياً. والمثال على هذا النوع من طرق التثبيت هو تصنيع الليوسين الثالثي ذي الوضعية -L (L-tertiary leucine) (الشكل 10.24)، وهو وسيط عديم التناظر المرآتي (Chiral) في إنتاج المواد الكيميائية.

يقود تثبيت النظم متعددة الأنزيمات (Multi-enzyme systems) الموجودة في الخلايا الكاملة أو في جسيمات الخلية إلى تحسينات ملحوظة في العملية مقارنة باستخدام الخلايا الحرة أو الأنزيمات المثبتة المنفردة أو المتعددة. إلا أنه يجب التفريق بين الحالات التي تكون فيها حيوية الخلية ضرورية والحالات التي تستخدم الخلايا الكاملة أو أجزاء منها بهيئة غير حية كمستحضرات خام من المحفزات الحيوية ذات الفعالية الواحدة (Single-activity biocatalysts) .

في الحالة الأولى، يجري التعامل فيها مع أشكال تحفيزية حساسة بحيث تتطلب تثبيتاً لطيفاً للغاية وضبطاً وثيقاً لشروط عملها من أجل الحفاظ على حيوية الخلية. تتوافق هذه الحالة، على سبيل المثال، مع عمليات التخمير بواسطة الخلايا المثبتة ومع مزرعة الخلايا الثديية المعتمدة على مرساة (Anchorage-dependent).

في بعض الأحيان، تفضَّل *نظم الخلايا المثبتة غير الحية (Immobilized, non-viable cell systems)* في تثبيت الأنزيمات المنفردة من أجل تجنب عمليات التنقية المكلفة أو لزيادة الثباتية التحفيزية (Catalytic stability) واستبقاء الأنزيمات المحتجزة بالشبيكة (Lattice-entrapped) بهيئة فعالة أكثر، من دون الحاجة إلى ضبط صارم لمسامية القالب. في هذا النوع من المحفزات الحيوية، يمكن استخدام إجراءات اللاحتجاز أوالارتباط المصممة للأنزيمات بشكلٍ آمن، بالرغم من كونه متوقعاً حدوث انخفاض في الإنتاجيات لكل وحدة وزن من المحفز الحيوي. إضافة إلى ذلك، يقوم الغشاء الخلوي بتعزيز مقاومة الانتشار (Diffusional resistances)،

مما يتطلب في أغلب الأحيان معالجات لزيادة النفاذية وذلك عن طريق التسخين، أو مخفضات التوتر السطحي (Surfactants) أو المذيبات. إن مثل هذه المعالجات يمكن أن تكون مطلوبة أيضاً لتعطيل فعالية الشوائب الأنزيمية الموجودة في الخلايا. بالإجمال، إن المستحضرات الخلوية المثبتة ذات الفعالية الواحدة (Single-activity) هي مناسبة للتطبيقات الصناعية، حيث يكون فيها انقاص الكلفة ضرورياً وضبط العملية كما إجراءات التصحيح أموراً قابلة للتطبيق.

يُعتبر تثبيت أنزيم ايزوميراز الغلوكوز (Glucose isomerase) أحد الأمثلة الصناعية والمهمة؛ فبكونه أنزيماً "داخلي خلوي" (Intracellular) باهظ الكلفة، جرى تثبيت الخلايا المنتجة له بنجاح حيث جرى استخدامها باستمرار على المستوى الصناعي في مفاعلات القعر المرصوص (Packed bed reactors). وقد تضمنت هذه الطريقة معالجات بالتسخين لتحطيم الأنزيمات الأخرى، وبالتالي تجنب تحطيم المركب الأولي (الغلوكوز) والمنتج (الفروكتوز). يُدرِج الجدول 5.24 أمثلة أخرى على طريقة التثبيت هذه المستخدمة في المجال الصناعي.

3.3.24 تأثير التثبيت في حركيات الأنزيم وخصائصه

Effect of immobilization on enzyme kinetics and properties

بالرغم من أن تثبيت الأنزيم يمكن أن يكون مفيداً جداً، إلا أن التثبيت يمكن أن يغير أيضاً حركيات (Enzyme kinetics) وخصائص أخرى للأنزيم، عادةً ما تكون انخفاضاً في فعالية نوعية الأنزيم (Enzyme specificity). ويمكن أن يُنسب هذا إلى عدة عوامل: (I) تأثيرات الشكل والفراغية (Steric effect)، (II) تأثيرات التفرق و (III) تأثيرات انتقال الكتلة والانتشار.

تأثيرات الشكل والفراغية Conformational and steric effects

إن انخفاض فعالية نوعية الأنزيمات (Enzymes specificity)، التي تحصل إما في حال الارتباط بالدعائم الصلبة أو عند تشابك جزيئات الأنزيم فيما بينها، يعود عادةً إلى تغيرات في شكل (Conformation) الأنزيم على مستوى البنية

الثالثة (Tertiary structure). على سبيل المثال، يمكن للروابط التشاركية التي تنشأ بين الأنزيم والقالب أن تسبب تمدداً لجزيء الأنزيم، وبالتالي للبُنية الثلاثية الأبعاد عند الموقع الفعال (Ative site) في الأنزيم. كما يمكن أن ينشأ مسخ (Denaturation) للأنزيم بتأثير الكواشف(Reagents) المستخدمة في طرائق الاحتجاز (Entrapment).

الجدول 5.24: أمثلة على خلايا كاملة مثبتة مستخدمة في عمليات تحويل مهمة صناعياً ذات أنزيم واحد أو أنزيمين

المحفز الحيوي الجرثومي	طريقة التثبيت	التطبيق
Escherichia coli	احتجاز	انتاج L–تريتوفان من الإندول والـــ DL– سيرين، وإنتاج L–حمض الأسبارتيك من حمض الفوماريك والأمونيا
Escherichia coli, Pseudomonas putida	احتجاز	إنتاج Cis– داي هايدروдايول (Dihdrodiol) من المركبات العطرية
Pseudomonas chlororaphis	احتجاز	إضافة الماء من الأديبو نيتريل(Adiponitrile) إلى 5– سيانوفاليراميد(Cyanovalermide)
Saccharomyces cerevisiae	ارتباط بالسطح	تحليل السوكروز
Rhodococcus rhodochrous J1	احتجاز	الأكريلاميد من الأكريلونيتريل
Rhodococcus rhodochrous J1	احتجاز	تحليل 3–سيانو بيريدين (3-Cyanopiridine) إلى نيكوتيناميد (Nicotinamide)
Solanum aviculare و *dioscoreadeltoidea*	احتجاز	S-(-)-Limonene إلى Cis carvone و transcarveol و
Mycobacterium sp. NRRL B-3805	ارتباط بالسطح	سيتوستيرول (Sitosterol) إلى

		أندروستينيديون (Androstenedione)
Zymomonas mobilis	احتجاز	إنتاج سوربيتول وحمض الغلوكونيك من الغلوكز والفروكتوز
Pseudomonas AMI	احتجاز	انتاج L–سيرين من الغلايسين والميثانول
Arthrobacter simplex و *Bacillussphaericus*	احتجاز	كلورامیدون (Chloramadinone) إلى ديلادينون الأسيتات (Deladinone acetate)، انتاج بريديونولون (Predniolone) من الكورتيزول (Cortisol)
Saccharomyces cerevisiae	احتجاز	الكحول من الألديهايد

ومن الممكن أيضاً أن يرجع انخفاض النوعية إلى العائق الفراغي (Steric hindrance) ما ينتج منه محدودية وصول المركب الأولي (Substrate) إلى الموقع الفعال. في هاتين الحالتين، بالإمكان تقليص انخفاض فعالية الأنزيم إلى حدها الأدنى، أو حتى منعها، من خلال اختيار شروط التثبيت المناسبة. وعليه، يمكن حماية مركز فعالية الأنزيم بمثبط خاص، أو بالمركب الأولي أو بالمنتج. كما يمكن تقليص تأثير الحجب (Shielding effect) من قبل الداعم الذي يسبب العوائق الفراغية من خلال إدخال *مباعدات*(*Spacers*) لإبقاء الأنزيم على بُعد مسافة محددة ومعينة من الداعم. فعن طريق إدخال مركبات ثنائية الوظيفة (Bifunctional)، مثل مركب 1,6– ثنائي الأمين السداسي (1,6-diaminohexane)، كمباعد، ازدادت الفعالية الخاصة بالاقتران التشاركي لأنزيم غلوكوأملاز (Glucoamylase) بالسيليكا المسامية بقدر عشرة أضعاف.

إضافةً إلى تأثيرها في فعالية (Activity) الأنزيم، يمكن لأي تفاعلات متبادلة فيزيائية أو كيميائية بين الأنزيم والقالب أن تغير بشكلٍ إضافي انتقائية وثباتية الأنزيم المربوط عمّا هي موجودة طبيعياً لدى الأنزيم الحر في المحلول.

تأثرات التفرق Partition effects

عندما يكون الداعم مشحوناً أو كارهاً للماء (Hydrophobic) في حالة ربط الأنزيم بالداعم، فإنه من الممكن أن يختلف سلوك حركية الأنزيم (Enzyme kinetics) المثبت عمّا هو في الأنزيم الحر حتى عند غياب تأثيرات انتقال الكتلة. يعود هذا الاختلاف عموماً إلى تأثيرات التفرق التي تسبب وجود تراكيز مختلفة من الفصائل المشحونة (Charged species)، والمركبات الأولية، والمنتجات، وأيونات الهيدروجين والهيدروكسيل ...إلخ، في البيئة الدقيقة (Microenvironment) للأنزيم المثبت وفي كتلة المحلول (Bulk solution)، مما يوجِد إليكتروستاتيكية (Electrostatic) ذات شحنات مثبتة عى الداعم.

إن التبعات الأساسية لتأثيرات التجزئة هذه هي تحول في الرقم الهيدروجيني الأمثل، مع انتقال سيماء فعالية الرقم الهيدروجيني للأنزيم المثبت تجاه القلوية (Alkaline pH values) الأكثر إذا كانت الحوامل سلبية الشحن أو تجاه الحموضة (Acid pH values) الأكثر إذا كانت الحوامل إيجابية الشحن. على سبيل المثال، يتحول الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنزيم الكيموتريبسين (Chemotrypsin) المثبت على داعم متعدد الأيون السالب الشحنة (Polyanionic support) – المكون من البوليمرَين: الإيثيلين(Ethylene) وأنهيدراد الماليك (Maleic anhydride) – وحدة واحدة (1 وحدة) نحو الجهة القلوية؛ بينما ذلك المثبت على داعم متعدد الكتايون الموجب الشحنة (Polycationic support) – المكون من بولي أورنيثين (Polyornithine) – فيتحول 1.5 وحدة نحو جهة الحموضة.

وانطلاقاً من الاعتبارات ذاتها، يمكن تقييم تفرّق المركبات المشحونة، أو المركب الأولي أو المنتج، بين جسيم الأنزيم المشحون وكتلة المحلول. فعندما يكون المركب الأولي إيجابي الشحنة، والأنزيم المستخدم المثبت سلبي الشحنة، فإنه يتم الحصول على تركيز أعلى للمادة الأولية في البيئة الموضعية أو البيئة الدقيقة ممّا هو في كتلة المحلول، كما يتم الحصول على قيمة أعلى للفعالية النسبية من تلك

التي تتحقق في حالة استخدام قالب متعادل الشحن (Neutral). إلا أنه عندما يوجد تأثيرات غير التفرق، فمن الممكن ألا يكون هناك تحول (انزياح) في الرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل للأنزيم المثبت على داعم مشحون.

تأثيرات انتقال الكتلة Mass transfer effects

عندما يثبت الأنزيم على أو في قالب صلب، فإنه من الممكن لتأثيرات انتقال الكتلة(Mass transfer effects) أن تتواجد لأنه لا بدّ للمركب الأولي من أن ينتقل من كتلة المحلول (Bulk solution) إلى الموقع الفعال (Active site) في الأنزيم المثبت. وإذ كان الأنزيم مرتبطاً بدعائم غير مسامية، فإن تأثيرات انتقال الكتلة هي خارجية فقط حيث تؤثر في السطح الخارجي المفعل تحفيزياً؛ وفي محلول التفاعل، كونه محاطاً بغشاء راكد، فإن المركب الأولي والمنتج ينتقلان عبر طبقة Nernst بالانتشار (Diffusion). إن القوة الموجِّهة لهذا الانتشار هو فرق التركيز بين السطح وكتلة المحلول من المركب الأولي والمنتج.

أما في حالة ثبيت الأنزيم على داعم مسامي، فإنه بالإضافة إلى تأثرات انتقال الكتلة الخارجية الممكنة، من الممكن أيضاً وجود مقاومة ضد الانتشار الداخلي للمركب الأولي (وذلك خلال انتشارها عبر الثقوب حتى تصل إلى الأنزيم) ومقاومة ضد انتشار المنتج نحو كتلة المحلول. وكنتيجة لذلك، فإنه ينشأ تحدر في تركيز المركب الأولي (Substrate concentration gradient) داخل الثقوب، مما يفضي إلى انخفاض التركيز مع المسافة (في العمق) من السطح المثبت عليه مستحضر الأنزيم. كما يتم الحصول على تحدر في تركيز المنتج المقابل بالاتجاه المعاكس.

خلافاً للانتشار الخارجي، يجري انتقال الكتلة الداخلي بموازاة التفاعل الأنزيمي، وهو يأخذ بالاعتبار استنفاذ المركب الأولي داخل الثقوب مع تزايد المسافة من السطح الداعم للأنزيم. كما أنه ولنفس السبب ، فإن معدل التفاعل ينخفض أيضاً. وبذلك، يعتمد التفاعل الإجمالي على تركيز المركب الأولي، وعلى المسافة من سطح الداعم الخارجي.

تأثيرات متنوعة Miscellaneous effects

هناك خصائص أخرى للأنزيم يمكن أن تتغير عند القيام بتثبيته. تتغير النوعية تجاه المركب الأولي، بالأخص عند استخدام مركب أولي ذي وزن جزيئي مرتفع، من خلال تأثير العائق الفراغي (Steric hindrance) ومقاوِمات الانتشار. كما أنه بسبب تغير شكل الأنزيم لدى تثبيته فإن الثوابت الحرائكية (Kinetic Vm constants و Km (أي ثابت ميكايلس– مينتن (Michaelis-Menten) المقياس وهو تركيز المركب الأولي الذي يحتاج إليه الأنزيم لكي يعمل بسرعة مساوية لنصف سرعته القصوى) للأنزيم المثبت تختلف عن تلك التي لدى الأنزيم الحر، مما يؤثر في الألفة (Affinity) بين الأنزيم والمركب الأولي. إضافة إلى ذلك، تُظهر بعض الأنزيمات المثبتة زيادة في طاقة فعاليتها والتي يمكن أن تعود إلى مقاوِمات الانتشار، خاصةً عند استخدام الدعائم المسامية.

4.24 تصنيع الكيماويات Synthesis of chemicals

1.4.24 تصنيع قليلات السكريات Synthesis of oligosaccharides

تشكل قليلات السكريات (Oligosaccharides) صنفاً معقداً من المركبات، وهي تُستخدم كثيراً في البيولوجيا الغلاكوجية (Glycobiology) التي تمتلك تطبيقات طبية هائلة. إن التصنيع الكيميائي هو مهمة شاقة عديدة الخطوات (Multi-step)، ما يجعل التصنيع البيولوجي مقاربة جذابة.

تحض أنزيمات ناقلات الغلايكوزيل (Glycosyltransferases) على انتقال أحادي السكريات (Monosaccharide) إلى قابلات السكريات (Saccharide acceptors). والأمثلة على ذلك هي انتاج أسيتيل اللاكتوز الأميني (Acetyllactosamine) باستخدام ناقلة بيتا–1,4–غلايكوزيل (β-1، 4-glycosyl transferase). لقد استُخدم هذا الأنزيم لتصنيع الطور الصلب من رباعيات السكريات (Tetrascchar ides) على قالب السيفاروز (Sepharose). كما استُخدمت أيضاً أنزيمات ناقلات الغلايكوزيل لإنشاء الارتباطات الغلاكوزيدية الصعبة كيميائياً،

كتلك المتَضَمَّنَة في تشكيل الألفا–سيالوزايدات (α-sialosides) والبيتا–مانوزيدات (β-mannosides)، المصنعَين بواسطة ناقلة بيتا–1,4–مونوزيل (B-1,4-monosyltransferase). مؤخراً، استُخدمت ناقلات بيتا–1,3–N–أسيتيل غلوكوزامينيل (β-1,3-N-acetylglocosaminyltransferases) لتصنيع البولي لاكتوزامين (Polylactosamine). غير أن ناقلات الغلايكوزيل تبقى نادرة وكلفة مركباتها الأولية هي مرتفعة بالنسبة إلى غيرها من المركبات.

لقد استُخدمت أنزيمات الغلايكوزيداز (Glycosidases) في عمليات التحليل المعكوس (التصنيع المضبوط التوازن) أو نقل الغلايكوزيل (Tansglycosidation) (التفاعلات المضبوطة حركياً). هذه الأنزيمات الموجودة في كل مكان هي قوية وناشطة جداً وبإمكانها أن تتحمل المذيبات العضوية. وقد عرفت عمليات الغربلة مؤخراً أنزيم الفوكوزيداز (Fucosidase) لتصنيع مركب الفوكوزايد المترابط برابطة ألفا–1,3 (A-1 3-linked fucoside), وأنزيم بيتا–غلاكتوزيداز (β-Galactosidase) لتصنيع كل من بيتا–1,3–، وبيتا–1,4–، وبيتا–1,6– وألفا–1,6– غالاكتوزايد (Galactoside). وكذلك في تصنيع قليلات السكريات استُخدمت أيضاً الخلايا الكاملة، مما يتيح التحويل الحيوي من مركبات سالفة (Precursors) رخيصة. فقد استُخدمت خلايا *E.coli* المهندسة وراثياً بشكل فعال لتصنيع قليلات السكريات الشيتينية (Chitooligoszccharides) ونظيراتها (Analogues) المضاف إليها مجموعة الأسيتيل عند ذرة الأوكسيجين (O-acetylated) أو المضاف إليها مجموعة الكبريت (Sulphate). غير أن عطاءات الإنتاج التي تحققها هذه المقاربة متواضعة (فوق الــ40% بصعوبة)، مما يجعلها غير قابلة للتطبيق اقتصادياً من أجل التصنيع على نطاق واسع.

والخيار الثالث الأكثر استحداثاً لتصنيع قليلات السكريات أنزيمياً يقع في استخدام أنزيمات الغلايكوسينثاز (Glycosynthases). وهذه الأنزيمات هي أنزيمات غلايكوزيداز (Glycosidases) مطفرة بصورة خاصة على مستوى بعض الثمالات المحددة بحيث تصنِّع قليلات السكريات، ولكن من غير أن تحلِّلها. وبذلك، لأن عمليات التحليل (Hydrolysis) غير المرغوبة تم تجنبها، فإن عطاءات عالية من المنتج تم

الحصول عليها. أدى العمل الريادي في هذا المجال إلى عدد محدود من أنزيمات الغلوكوسينثاز القادرة على انتاج تشكيلة من قليلات السكريات وذلك من مانحات الغلايكوزيل المتوفرة بشكل شائع. وبغية توسيع المجال التطبيقي لهذه المقاربة، تم تطفير عدة أنزيمات من هيدرولاز الغلايكوزيد (Glycoside hydrolases) لإنتاج أنزيمات الغلايكوسينثاز وتصنيع قليلات السكر مثل قليلات السكر السلولوزية المترابطة بروابط بيتا-1,4-β-1-1، 4-linked (cellulosligosaccharides، أو 4- نيتروفينيل – بيتا- أسيتيل اللاكتوز الأميني-4-nitrophenyl-β) (acetyllactosamine، أو رباعيات السكريات المترابطة بروابط بيتا-1,3- أو بيتا-1,6-، أو المانوزيدات (Mannosides) المترابطة بروابط بيتا-1,3-أو بيتا-1,4- أو الغلايكانات (Glycans). حيث تم الحصول على ما يزيد على 60% من عطاءات الإنتاج.

ومن أجل تحسين مواصفات أنزيمات الغلايكوسينثاز، فقد تم تطفير ثمالات أكثر في هذه الأنزيمات التي تؤدي تحديداً إلى زيادة فعالية عملية إضافة الغلايكوزيل (Glycsylation)، والحصول عطاءات إنتاج أعلى، وتخفيض وقت التفاعل وتحقيق نظام إنتاج أوسع.

مؤخراً، تم الحصول على أنزيمات من الغلايكوزايداز قادرة على إنتاج الثايوغلايكوزيد (Thioglycoside). وهذه المحفزات الحيوية، المسماة ثايوغلايكوليغاز (Thioglycoligases) تستخدم السكريات المرتبطة بمجموعة الثايول (SH-sugars) كقابلات، التي هي أكثر منحاً للإلكترون (Nucleophilic) من السكريات المرتبطة بمجموعة الهيروكسيل (OH-sugars).

2.4.24 تصنيع رابطة C-C في التحويلات الحيوية

Synthesis of C-C bonds in biotransformation

إن التصنيع الحيوي لروابط C-C هو أمرٌ ضروري في الكيمياء التصنيعية العضوية. طبيعياً، يتم تصنيع روابط C-C حيوياً بواسطة أنزيمات الليغاز (Ligases) التي تتطلب جزيئات الــATP المكلِفة كعوامل مساعدة. لذلك فإن

الأنزيمات الأخرى كـــ(ترانس) ألدولاز (Trans)aldolase)) و(ترانس) كيتولاز (Trans) ketolase))، التي لا تتطلب ATP، هي المفضلة لمثل هذه الأهداف. ومع ذلك، فإن معظم أنزيمات الألدولاز تحتاج إلى مركبات سالفة مفسفرة (Phoshorelated precursors)، لكن أنزيم 2–ديأوكسيرايبوز–5–فوسفات لألدولاز (2-deoxyribose-5-phosphate aldolase) يمكن استخدامه في إنتاج الإبوثايلون (Epothilones) وهو صنف من المركبات التي يمكن أن تكون ذات خصائص مضادة للسرطان، من غير الحاجة إلى مركب أولي مفسفر. وأنزيم ديكاربوكسيلاز البيروفات (Pyrovate decarboxilase)، الذي هو كيتولاز (Ketolase) قاطع لرابطة C-C، يجري استخدامه حالياً لتصنيع مركب الفينيل أسيتيل كاربينول (Phenylacetylcarbinol) الوسيط في إنتاج الإفيدرين (Ephedrine)، من البيروفات أو الأسيتالديهايد (Acetaldehyde) والبينزالديهايد (Benzaldehyde). كما يحض هذا الأنزيم على إنتاج حمض البيروفيــك (Pyrvic acid) من الأسيتالديهايد وثاني أوكسيد الكربون، بعطاء إنتاج يفوق الـــ 80%. كما يحفز أنزيم ديكاربوكسيلاز البينزويلفورمات (Benzoylformate decarboxylase) الربط الكربوني (Carboligation) لمجموعة واسعة من الألديهايدات الحلقية (Cyclic aldehydes) والألديهايدات غير المشبعة المدمجة مع الأسيتالديهايد (Acetaldehydes).

إن جينات هذه الأنزيمات، المعزولة أصلاً من النباتات، تم تنسيلها (كلونتها) بنجاح والتعبير عنها في *Escherichia coli*، و *Saccharomyces cerevisiae* و *Pichia pastoris* ، فهي تقدم محفزات حيوية نافعة من أجل تصنيع سيانوهايدرينات S– وR (S-R-cyanohydrins)، التي تؤمن أحجار البناء لتصنيع ألفا–هيدروكسي حمض الكاربوكسيل (α-hydroxycarboxylic acid)، أو الأحماض الأمينية–ألفا (α-amino acids)، أو 1,2– أمينو الكحول (1,2-aminoalcohols) أو 1,2 –ثنائيات الأمين (1,2-diamines).

الجدول 6.24: تصنيع المحفز الحيوي من بعض المصاوغات المرآتية (Enontiomers)

المحفز الحيوي	المركب الأولي	المنتج	العطاء[أ]	Ee (%)
Sphingomonas paucimobilis	4-Benzyloxy-3-methanesulfonylamino-2’-Bromoacetophenone	(R)–كحول	85<	98<
Mycobacterium neoaurum	Methyl-phenylalanine amide راسيمي	(S)–حمض أميني	48[أ]	98
الإستيراز من كبد الخنزير	Methyl-(4-methoxyphenyl)-propanedioic acid, ethyl diester	(S)– أحادي الإستر	96.7	96
Rhodococcus MB 5655	Indene	Cis–(1S,2R)– إندان دايول (Cis-(1S,2R)-indandiol)	–	99
Rhodococcus MA 7205	Indene	Trans–(1R,2R)– إندان دايول (Trans-(1R,2R)-indandiol)	–	98
Aspergillus niger، *Rhodotorula glutinis*	1-{2’,3’-dihydro-benzo[β]furan-4’-L}-1,2-oxirane راسيمي	(R)–دايول ((R)-diol)	45[أ]	95
ليباز مثبت	(3R)-cis-3-acetyloxy-4-(1,1-dimethylethyl)-2-azetidinone	(S)–كحول	48<	99

[أ] 50% من الحد الأقصى النظري.

3.4.24 تصنيع مركبات وسيطة عديمة التناظر

Synthesis of chiral intermediates

إن فعالية العديد من الأدوية تعتمد على خاصية انعدام التناظر (Chirality)، لأنه غالباً ما يكون مصاوغ مرآتي واحد (Enontiomer) في المزيج الراسيمي (Racemic mixture) هو الذي يمتلك الفعالية المطلوبة. والتفاعلات المحفزة أنزيمياً هي في أغلب الأحيان ذات انتقائية فراغية (Streoselectivity) وانتقائية ناحية (Regioselectivity) عاليتين، ما يجعل هذه المقاربة أداة فعالة لإنتاج وسائط عديمة التناظر المرآتي وكيماويات دقيقة. يقدم الجدول 6.24 بعض الأمثلة على استخدام المحفزات الحيوية في تصنيع مصاوغ مرآتي واحد لمركبات أساسية معدومة التناظر المرآتي.

تضم التطبيقات الأخرى للتفاعلات المحفزة أنزيمياً تصنيع السينثونات (Synthons) المنعدمة التناظر المرآتي من أجل إنتاج أدوية الضغط، كالـــ Omapatrilat، في عملية متعددة الأنزيمات (Multi-enzyme process) تتطلب تجدد العامل المساعد NAD/NADH؛ والأدوية المضادة للفيروسات، كالـــCrixivan، الذي يثبط أنزيم البروتياز (Protease) عند فيروس نقص المناعة (HIV)، أو الـــAbacavir، وهو مثبط انتقائي للناسخ العكسي (Reverse transcriptase)، يُستخدم للعلاج من إصابات فيروس HIV وفيروس التهاب الكبد من النوع B (Hepatitis B)، أو Lobucavir، المستخدم لعلاج القوباء (Herpes)؛ والأدوية المضادة للكوليستيرول؛ والأدوية المضادة للسرطان، كالـــpaclitaxel، المثبط لعملية الـــ depolymerization لبروتين الأنيبيبات (Microtubulin)، أو -)-15-deoxyspergualin)، وهو عامل كابت للمناعة ومضاد للورم.

يمكن تحقيق عملية التكثف لإستر الكربوكسيليك (Acylion condensation) باستخدام إما أنزيم ديكاربوكسيلاز البيروفات (Pyrovate decarboxilase) من الخميرة، أو أنزيم ديكاربوكسيلاز البينزويل فورمات (Benzoylformate decarboxilase) البكتيري أو أنزيم ديكاربوكسيلاز الفينيل بيروفات (Phenylpyruvate decarboxylase). إن الأسيلوينات (Acyloins)

التي هي ألفا–هيدروكسي كيتونات (A-Hydroxyketones)، متقاربة في تصنيعها الحيوي من حيث طبيعتها الثنائية الوظيفة، التي تعود بشكلٍ رئيسي إلى وجود مركز واحد لانعدام التناظر المرآتي (Chiral center) المطاوع للتعديلات الإضافية. تتراوح نسبة شكلٍ واحد منعدم التناظر المرآتي من المنتج النهائي بين 87%–98%، مما يدل على أن الأنزيمات تنفذ تفاعلات عالية الانتقائية.

4.4.24 التحفيز الحيوي لعمليات الخزلدة Redox biocatalysis

ترتبط تفاعلات الخزلدة (Redox reactions) بشكلٍ وثيق بعمليات الإنتاج الانتقائية، من حيث الناحية (Regio-selectivity) أو الفراغية-Stereo) (selectivity أو المصاوغة المرآتية (Enontio-selectivity)، للمواد الكيميائية الهامة في الصناعات الكيميائية الزراعية، والأطعمة والأدوية. تُحفِّز هذه التفاعلات أنزيمات الأوكسيداز والريدكتاز (Oxido-reductase) التي تتفاعل مع المركب الأولي عبر انتقال الإلكترون. إن معظم هذه الأنزيمات هي معتمدة على العوامل المساعدة (Co-factor dependent)، ولهذا فإن نظم التحويل الحيوي (Bioconversion systems) التجارية هي محدودة بتطوير عملية إعادة تدوير العوامل المساعد الثمينة بشكلٍ فعّال. تمثل المركبات: NAD^+/ NADH، و$NADP^+$/NADPH، وFAD^+/FADH وADP/ATP أكثر العوامل المساعدة المُحتاجة شيوعاً. في أغلب الأحيان يكون استخدام الخلايا الكاملة بديلاً مُجدياً عن استخدام الأنزيمات، بشرط ألا يكون لوجود الأنزيمات الأخرى في الخلية تأثيراً سلبياً في نقاوة المنتج والعطاء. فعندما يكون هناك تجدد للعوامل المساعدة، تُتَجنّب العمليات المكلفة لاسترجاع الأنزيم وتنقيته، كما يتم تأمين استقرار أكثر في البيئة الدقيقة.

المحفزات الحيوية التأكسدية Oxidative biocatalysts

يمكن تنفيذ تفاعلات الأكسدة (Oxidative reactions) عن طريق تشكيلة واسعة من أنزيمات الأكسدة التي تشمل أنزيمات: المونوأوكسيجيناز (Monoxygenases)، ثنائيات الأوكسيجيناز (Dioxygenases)، الأوكسيداز

(Oxidases) والبيروكسيداز (Peroxidases). تضم التطبيقات الحالية لأنزيمات الــMonooxygenases أكسدة الكيتونات (Ketones) إلى إسترات (Esterates) أو لاكتون (Lactones) عبر تفاعل من نوع Bayer-Villiger، وإنتاج الــR- إيبوكسيد ((R)-epoxides) من الألكينات الطرفية (Terminal alkenes)، وتحويل الأرين (Arenes) إلى ألديهايد (Aldehydes) وإنتاج الهيدروكسي بينزالديهايد (Hydroxybenzaldehydes) من الفينول المستبدل (Substituted phenol). وتُستخدم أنزيمات الــDioxyenases لإضافة مجموعة الهايدروكسيل (Hydroxylate) على الهيكسين الحلقي (Cyclohexene) والأرينات لتحويلها إلى الدايول (Diols). ويمكن أن تُستخدم أنزيمات الــ Oxidases في أكسدة النيوكليوزايدات (Nucleusides) نوعياً من حيث االناحية (Regio-specific oxidation) وفي الأكسدة الانتقائية (Selective oxidation) للبيرانوز (Pyranoses).

أما أنزيمات اللاكاز (Laccases) فلديها، خصيصاً، رصيفة واسعة من المركبات الأولية، وهي الألكينات (Alkenes)، وأمينات الأريل (Aryl amies)، ومشتقات الفينول (Phenol derivatives) والبولي الفينول (Polyphenols) والبولي أمين (Polyamines). كما يتعرّفون على الليغنين (Lignin) **(في الخشب)** كمركب أولي أيضاً. كما أنه عندما تكون المركبات الأولية ذات قوة اختزال وأكسدة عالية، فإن ذلك يتطلب موسِّطاً (Mediator) **(مثلاً 1-hydroxybenzotriazole)**، الذي يعمل كمركب أولي وسيط (Intermediate substrate) للأنزيم، بحيث يقوم الشكل المؤكسد منه بأكسدة المركب الأولي الحقيقي. وأخيراً، بالنسبة إلى أنزيمات الــPeroxidase فيتم استخدامها لأكسدة الهيدروكربونات العطرية (Aromatic hydrocarbons) إلى الــaldehydes، ولتحويل السلفيد (Suphide) إلى سلفوكسايد عديم التناظر المرآتي (Chiral sulphoxides)، ولإدخال الأداء الوظيفي للــoxo (oxo-functionality) إلى الداايينات(Dienes) المندمجة الحلقات.

تفاعلات الاختزال Reductions

يمكن تنفيذ الاختزال غير المتناظر(Asymmetric reduction) على الكيتونات (Ketones) لإعطاء كحول غير راسيمية منعدمة التناظر المرآتي(Non-recimic chiral alcohols) وذلك من خلال محفزات حيوية مختلفة تضم خميرة الخبز وأنزيمات متنوعة من نازعات الهيدروجين (Dehydrogenases) التي تشتمل على نازعة هيدروجين الكحول من خميرة الخبز، والبكتيريا *Thermoanaerobium brockii* وأنواع *Pseudomonas*؛ ونازعة الهيدروجين في كبد الحصان و نازعة هيدروجين الهيدروكسي ستيرويد (Hydroxysteroid dehydrogenase) من فطر *Geotrichum candidum*، حيث إن المختزِلات (Reductants) (مصادر الهيدروجين) هي ضرورية لتحقيق هذه التفاعلات. ففي الاختزال المحفز حيوياً، يمكن استخدام الكحول مثل الإثانول (Ethanol) و2–بروبانول (2-Propanol)، والغلوكوز وحمض الفورميك (Formic acid)، من ضمن آخرين.

الجدول 7.24: طرائق تجديد العامل المساعد (Co-factor)

العامل المساعد	طريقة التجديد	التفاعل
ATP	أسيتيل الفوسفات (aetyl phosphate) وكيناز الأسيتات (acetate kinase)	انتقال الفوسفوريل (phosphoryl)
NAD^+	نازعة الهيدروجين من الغلوتامات (glutamate dehydogenase) مع ألفا–كيتو غلوتارات (α-ketoglutarate)	نزع الهيدروجين
NADH	نازعة الهيدروجين من الفورمات (furmate dehydogenase) مع الفورمات	إضافة الهيدروجين
$NADP^+$	نازعة الهيدروجين من الغلوكوز مع الغلوكوز	نزع الهيدروجين
NADPH	تجدد ذاتي	إضافة الهيدروجين
الفلافين (flavins)		مزج بالأوكسيجين

تجدد العوامل المساعدة Regeneration of cofactors

بسب كلفتها المرتفعة، لا يمكن للعوامل المساعدة (Co-factors) (NAD^+/NADH أو $NADP^+$/NADPH) أن تُستخدم كعوامل مكافئة (Stoichiometic agents) في التحفيز الحيوي التحضيري، لذلك لابد من تجددها في الموقع *(in Situ)*. يجب أن يوفي نظام التجديد الفعال للعامل المساعد عدة متطلبات، ولكن قبل كل هذا لابد من أن يكون *عدد التحول الإجمالي* (TTN) (*Total turnover number*) للعامل المساعد مرتفعاً. إن الــTTN هو العدد لمجموع مولات (Moles) المنتج التي تشكلت من كل وحدة مول من العامل المساعد خلال دورة تفاعل كاملة. وكقاعدة الإبهام(Rule of thumb) يمكن أن تؤمن قيمة الــTTN بين 10^3 و10^5 نظام تفاعل قابل للتطبيق. لقد قيست الطرائق الكيميائية والإلكتروكيميائية والأنزيمية على أنها مقاربات فعالة لتجديد العامل المساعد. إلا أنه بسبب أن المقاربتين الأُولتين تفتقدان إلى الانتقائية المطلوبة من أجل الحصول على TTN مرتفع فإن المقاربة الأنزيمية هي المحبذة حالياً. والأمثلة على الطرائق الأنزيمية لتجديد العامل المساعد مقدمة في الجدول 7.24.

تشتمل التطويرات الحديثة لتجديد عوامل نيوكليوتايد البايريدين (Pyridine nucleotide) المساعدة بالطريقة الأنزيمية اكتشاف أنزيم نازعة هيدروجين الفوسفات (Phosphate dehydrogenase)، وهو الأنزيم الواعد لتجديد الــNADH. مقاربة أخرى لتجدد الــNADH تضمنت استخدام بلورات أنزيمية متشابكة (Cross-linked enzyme crystals) من أجل إنتاج السينام ألديهايد (Cennamaldehyde). في هذه المقاربة كان العامل المساعد موجوداً خلال عملية البلورة بحيث انخرط في تجديده أنزيم نازعة هيدروجين المركب المكون من الــNADH والكحول-NADH) alcohol dehydrogenase) وبلورات أنزيمية متشابكة.

أما التطويرات الحديثة لتجدد الــNADPH فقد تضمنت استخدام أنزيم ترانس هايدروجيناز لنيكليوتيد البايريدين المنحلة (Soluble pyridine nucleoide transhydrogenase) الذي يحفز انتقال ما يعادل من المختزِلات بين الــNAD(P) والــNAD(P)H.

يقدم أنزيم أوكسيداز الـــNADH (NADH oxidase) المأخوذ من بكتيريا *Lactobacillus brevis* والمولد للماء من جراء أكسدته للــNADH، بديلاً قوياً عن الطريقة الأنزيمية التقليدية لتجديد الــNAD^+ التي يُنتج فيها الـــ H_2O_2 السام.

لقد جرى مؤخراً تنسيل (كلونة) اثنين من جينات أنزيم أوكسيداز الـــNADH الجديدة المأخوذتين من بكتيريا *L. Sanfranciscensis* و *Borrelia burgdorferi* والتعبير عنها بإفراط (Over expression) في الـــ*E. Coli*. تقبل أنزمات الأوكسيداز الجديدة هذه كل من الـــNADH والـــNADPH وبذلك يمكن استخدامها لتجديد الــ$NAD(P)^+$.

لطالما جرى التحدي في تطوير المفاعلات الكهروكيميائية (Electrochemical reactors) التحضيرية من أجل تجديد العوامل المساعدة، وذلك بسبب كلٍّ من كلفة زيادة الانتاجية والحاجة إلى أسطح أقطاب كهربائية (Electrode) واسعة. وبالرغم من هذه الصعوبات، فقد تم إثبات أن المفاعل ذا غشاء الترشيح الفائق (Ultrafiltration membrane reactor) يقدم أداة مجدية في التجديد الكهروكيميائي للــNADH المقترن بتصنيع الهيكزانول (Hexanol) الحلقي من الهيكزانون الحلقي (Cyclohexanon).

تضمن العديد من تطبيقات أنزيمات نازعات الهيدروجين والمونوأكسيجيناز (Monooxygenases) استخدام الخلايا الكاملة. لا يجب أن يحُد معدل تجديد الـــNAD(P)H الطبيعي من فعاليات (Activities) الأوكسيجيناز /نازعة الهيدروجين لدى حوالى 100μg وزن جاف، لكنه يمكن أن يصبح مقيداً لدى فعاليات أعلى أو باستخدام خلايا في طور الراحة (Resting cells). وللتعامل مع هذه الحالات، فقد نُفِّذ تعبير مفرط عن أنزيمات الانتاج والتجديد بشكلٍ متزامن. كما يمكن، وكبديلٍ عن ذلك، إضافة أنزيمات تجديد العامل المساعد المنقاة إلى المستحضرات الخلوية الكاملة. أما المقاربة المختلفة والأكثر جذرية فتضمنت تطوراً موجّهاً (Directed evolution) للسيتوكروم P450 المتنوع بحيث تستبدِل فعالية مانح الإلكترون من خلال البيروكسيد (Peroxide) متطلبات الـــNADPH.

5.4.24 التحفيز الحيوي الاندماجي Combinatorial biocatalysis

التحفيز الحيوي الاندماجي (Combinatorial biocatalysis) هو مجال آخر للمعرفة التي تستغل الإنتاجية العالية للطرائق (انظر أيضاً الفصل الثاني عشر). يركز التحفيز الحيوي الإندماجي على إنشاء مكتبات من خلال عمليات التحول المتكررة للمركبات الطليعة المحفزة بواسطة الأنزيمات أو الخلايا الكاملة. وضمن الدورات المتتابعة لخطوات التحفيز الحيوي التي تضم عمليات الأسيلة (Acylation)، والارتباط بالغلايكوزيل (Glycosylation)، والهلجنة (Halogenations)، والأكسدة (Oxidation) والاختزال (Reduction)، فإنه يتولد مجموعات ضخمة من المركبات المشتقة التي تُعتبر أحجار البناء والتي يمكن أن تكون مفيدة في إنشاء جزيئات جديدة أو من أجل تعديل المركبات الطبيعية المعقدة. وبذلك، يُعتبرالتحفيز الحيوي الاندماجي أداة مفيدة في اكتشاف الدواء من أجل الصناعة الدوائية. على سبيل المثال، لقد استُخدم أنزيم الليباز (Lipase) لتحضير مكتبة اندماجية مكونة من 24 إستراً (Ester) وذلك ابتداءاً من أربع مركبات كحول عطرية (Aromatic alcohols) وست مركبات من فِنِل الإستر (Vinyl esters) كمانحات لمجموعة الأسيل (Acyl). وعلى نحوٍ مشابه، تم انتاج مجموعة من الببيتبدات باستخدام اندماجات من أزيمات سينثاتاز الببيتيد (Peptide synthetases) ومركبات أولية من الأحماض الأمينية المختلفة.

5.24 مفاعلات الأنزيم المثبت Immobilized Enzyme Reactors

1.5.24 تصنيف المفاعلات الأنزيمية

Classification of enzyme reactors

من ضمن تطبيقات الأنزيمات المثبتة (Immobilized enzymes)، استخدامهم في مجال الصناعة، وهو ربما الموضوع الأهم، وبالتالي الأكثر مناقشةً. إن استخدام الأنزيمات المثبتة في العمليات الصناعية تم تنفيذه أيضاً في المفاعلات الكيميائية الأساسية. يعرض الجدول 8.24 تصنيف المفاعلات الأنزيمية على

أساس نمط التشغيل وخصائص انسياب (جريان) المركب الأولي والمنتج. كما يبين الشكل 11.24 أشكال أنواع المفاعلات المختلفة.

الشكل 8.24: تصنيف المفاعلات الأنزيمية

نمط التشغيل	نمط الانسياب (الجريان)	نوع المفاعل
بدفعة واحدة	ممزوج جيداً	مفاعل الحوض المخفوق بالدفعة (BSTR) (Batch stirred tank reactor)
	انسياب مُقنَّن	مفاعل إعادة التدوير الكلي
مستمر	ممزوج جيداً	مفاعل الحوض المخفوق المستمر (CSTR) (Continuous stirred tank reactor)
		CSTR مع غشاء ترشيح فائق
	انسياب مقنن	مفاعل ذو قعر مرصوص (PBR) (Packed bed reactor)
		مفاعل ذو قعر مسيّل (FBR) (Fluidized bed reactor)
		مفاعل أنبوبي (آخر)
		مفاعل ليفي مجوَّف

2.5.24 مفاعلات الدفعة Batch reactors

إن أكثر ما تُستخدم فيه مفاعلات الدفعة هو عندما تكون المحفزات أنزيمات منحلة، بحيث لا يتم فصلها بشكل عام عن المنتجات، وبالنتيجة لا يجري استرجاعها من أجل إعادة استعمالها.

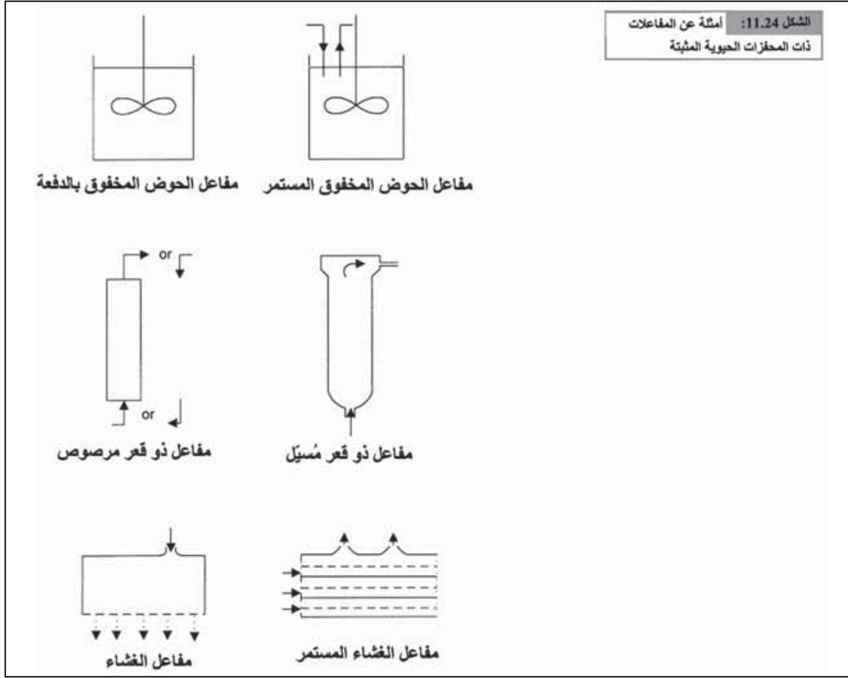
ولأنه من الأهداف الرئيسية لتثبيت الأنزيم هو إتاحة إعادة استخدامها، فإن استعمال الأنزيمات المثبتة في مفاعلات الدفعة (Batch reactors) يتطلب عملية فصل (أو عملية فصل إضافية) من أجل استرجاع المستحضر الأنزيمي. وخلال

عملية الاسترجاع هذه، يمكن أن يحصل خسارة قيِّمة من مادة الأنزيم المثبت وكذلك خسارة لفعاليته. قديماً، تم استخدام مفاعل الحوض المخفوق (Stirred tank reactor) في العمل بطريقة الدفعة، الذي يتكون من مفاعل وخفاقة، وهو النوع الأبسط من المفاعلات بحيث يسمح بمزجٍ جيد وسهولة نسبية في ضبط الحرارة والرقم الهيدروجني (pH). غير أن بعض القوالب، كالدعائم غير العضوية، تتكسر بفعل قوى الجز في بعض الأوعية، وبذلك تم تجربة تصاميم بديلة باستخدام *مفاعل السلة* (*Basket reactor*) الذي يستبقي المحفز داخل *سلة* إما ليشكل *شفرات* (*Blades*) الدافعة أو عوارض (Baffles) لمفاعل الحوض.

بديلٌ آخر من المفاعلات يكمن بتغيير نمط الانسياب(الجريان) هو المفاعل ذو الانسياب المُقنَّن (المضبوط بالسدادة) (Plug flow reactor): وهو مفاعل إعادة التدوير الكلي أو إعادة دوران الدفعة، الذي يمكن أن يكون ذا قعر مرصوص (Packed bed reactor) أو مسيّل (Fluidized bed reactor) أو حتى ذا شكل أنبوبي مُغشى (Coated tubular reactor). هذا النوع من المفاعلات هو مفيد في حالة الحصول على تحولات غير كافية جراء دورة التشغيل الواحدة. وقد لاقى أكبر تطبيق له في المختبر من أجل استجلاب بيانات الحركية (Kinetic data)، عند ضبط معدل إعادة التدوير، وبذلك يكون التحويل في المفاعل منخفضاً حيث يمكن اعتباره كمفاعل تفاضلي. إن إحدى ميزاته تتجلى في إمكانية تخفيض تأثيرات انتقال الكتلة الخارجي (External mass transfer) وذلك بتشغيل سرعات انسياب عالية.

3.5.24 المفاعلات المستمرة Continuous reactors

تمتلك العمليات المستمرة (Continuous operations) للأنزيمات المثبتة بعض الميزات الأخرى لدى مقارنتها بعمليات الدفعة (Batch processes)، كسهولة الضبط آلياً، وسهولة التشغيل وضبط نوعية المنتجات. كما يمكن أن تنقسم المفاعلات المستمرة إلى نوعين أساسيين: *مفاعل الحوض المخفوق ذي التغذية المستمرة* (CFSTR) (*Continuous feed stirred tank reactor*) *ومفاعل الانسياب المُقنَّن (المضبوط بالسدادة)* (PFR) (*Plug flow reactor*).



في الــCSTR المثالي، تبقى درجة التحويل (Conversion) مستقلة عن موقع الوعاء طالما كان الامتزاج متحققاً بشكلٍ كامل من خلال الخفق وكانت الظروف داخل الــCSTR هي نفسها كما في المجرى الخارج، أي أن تراكيز المركب الأولي منخفضة وتراكيز المنتج مرتفعة. أما في الــPFR المثالي، فتعتمد درجة التحويل على طول المفاعل وذلك لعدم وجود آلة المزج من الأساس، بحيث لا تكون الشروط داخل المفاعل متناسقة أبداً.

في حين أنه يمكن الحصول بسهولة على CSTR (لأنه من الضروري فقط توفر خفق جيد لتحقيق المزج الكامل)، غير أنه من الصعب جداً التوصل إلى PFR مثالي. فهناك العديد من العوامل المعاكسة التي غالباً ما تحصل في السعي إلى تحقيق PFR مثالي، كالحرارة وسرعة التحدرات (Velocity gradiants) المتعامدة مع اتجاه الانسياب (الجريان) والانتشار المحوري للمركب الأولي.

هناك عدة اعتبارات تؤثر في نوع المفاعل المستمر الذي يجب اختياره للاستعمال المحدد، أحد أهم المعايير هو قائم على أساس الاعتبارات الحركية (Kinetic). فبالنسبة إلى حركيات ميكايلس– منتن -Michaelis)

(Menten، فإن الـــ PFR هو مفضل على الـــ CSTR، لتطلُّب الـــCSTR أنزيمات أكثر من أجل الحصول على نفس درجة التحول كـــ PFR. وفي حالة حدوث تثبيط من قبل المنتج، فإن هذه المشكلة تتفاقم، كما يحصل في الـــCSTR حيث إن تركيز المنتج المرتفع يجعل المنتج في تماسٍ مباشر مع كل المحفز. حالة واحدة فقط هي التي يمكن أن يكون فيها الـــCSTR مفضلاً على الـــPFR، وذلك عندما يحصل تثبيطاً من قبل المركب الأولي.

يؤثر أيضاً في اختيار نوع المفاعل شكل ومواصفات مستحضرات الأنزيم المثبت، كما تبقى متطلبات التشغيل عاملاً آخر لا بد من أخذه بعين الاعتبار. لذلك، عندما يكون ضبط الرقم الهيدروجيني (Ph) ضرورياً، مثلاً مع استخدام أنزيم أسيلاز البينيسيلين (Penicillin acylase)، يصبح الـــCSTR أو مفاعل الدفعة ذو الحوض المخفوق (Batch stirred tank reactor) أكثر ملاءمةً من مفاعلات الـــPFR. وبسبب إمكانية تفكك الداعم من خلال قوى القص (Shear) الميكانيكية، فإنه يجب أن تُستخدم فقط المستحضرات المتينة من الأنزيمات المثبتة في أنواع الـــCSTR. ومع جسيمات الأنزيم المثبتة الصغيرة جداً، تظهر مشاكل مثل الهبوط المرتفع للضغط وحصول الانسدادات، جراء استخدام هذا المحفز الحيوي في مفاعلات ذات قعر مرصوص (Packed bed reactors) (النوع الأكثر إستخداماً من مفاعلات الـــPFR). للتغلب على هذه المشاكل، فإن المفاعل ذا القعر المسيَّل، الذي يؤمن درجة مزج متوسطة بين الـــCSTR والـــPFR، من الممكن استخدامه ومع تحقيق هبوط منخفض للضغط.

تشكل مواصفات المركب المتفاعل (Reactant) عاملاً آخر في التأثير في اختيار المفاعل. إن المركبات الأولية والمواد المنتجة غير المنحلة وأيضاً السوائل اللزجة هي المفضلة للاستخدام في المفاعلات ذات القعر المسيَّل الـــCSTR، بحيث ليس من المحتمل حصول انسدادت للمفاعل، كما سيكون في حالة المفاعل ذي القعر المرصوص.

يمكن الاستنتاج من هذا الموجز، أنه ليس هناك من قواعد بسيطة لاختيار نوع المفاعل، وأنه يجب تحليل العوامل المختلفة المذكورة بشأن الحالة المعنية المحددة باستقلالية.

6.24 المحفزات الحيوية في الأوساط غير التقليدية
Biocatalysts in non conventional media

إن الماء باعتباره وسط التفاعل الضروري للمحفزات الحيوية قد أُيِّد استخدامه ودوفِع عنه لسنين عديدة على أنه أحد الميزات الأساسية في عمليات التحويل الحيوية (Bioconversions). إلا أنه هذا المسمى بالميزة قد تم إثبات أنه أحد أشد القيود التي تعيق توسع نطاق تطبيقات المحفزات الحيوية، خصوصاً عندما تكون المواد المتفاعلة ضعيفة الانحلال في الماء. تضم الأوساط غير التقليدية التي جرى استخدامها كل من المذيبات العضوية، وبعض الغازات، والسوائل فوق الحرجة (Super-critical fluids). لقد تم تناول نطاقات ومحدوديات هذه النظم المختلفة أدناه.

1.6.24 المحفزات الحيوية في الأوساط العضوية

Biocatalysts in organic solvents

لقد قُدِّمت الأمثلة الأولى لاستخدام المحفز الحيوي/الأنزيم في المذيبات العضوية من أجل تحويل المركبات الكارهة (الطاردة) للماء منذ أكثر من 20 سنة. هناك عدة أمثلة تبين تصنيع الببتيدات (كـ$acphealanh_2$) من الأحماض الأمينية بتحفيز أنزيم البروتياز (Protease)، وإنتاج المحليات، الأسبارتام (Aspartam) (L- aspartyl-L-phenylalanine methyl Ester)، بواسطة أنزيم الثيرمولايزين (Thermolysin) والإثيل أسيتات (Ethyl acetate) كمذيب، واستخدام أنزيمات الليباز (Lipases) في تفاعلات الأسترة (Esteriication)، وتوزيع الجزيئات التبادلي (Transesterification) والأسترة البينية (Interesterification)، وفي تصميم مركبات المصاوغة المرآتية (Enontiomers).

الجدول 9.24: مواصفات التحويل الحيوي ذو الطورين السائلين
الميزات
الانحلالية العالية للمركب الأولي والمنتج
الانخفاض في كمية المركب الأولي وتثبيط المنتج
سهولة استجاع المنتج والمحفز الحيوي
انحلالية الغاز العالية في المذيبات العضوية
تحوّل (انزياح) توازن التفاعل
المحدوديات
انمساخ المحفز الحيوي و/أو التثبيط بواسطة المذيب العضوي
زيادة تعقيد التفاعل

إن لادخال المذيب العضوي في نظام التفاعل عدة ميزات (الجدول 9.24). فالمذيب العضوي يمتاز بزيادته انحلالية المركبات ضعيفة الانحلال في الماء أو غير المنحلة، وبذلك فهو يؤدي إلى زيادة الإنتاجية الحجمية (Volumetric productivity) لنظام التفاعل. كما تتجلى ميزته الأخرى والهامة في تحول (انزياح) توازن (Equilibrium) تفاعل التحلل المائي بما يؤيد إنتاج المنتج الذي يُستخلص إلى الطور العضوي، ممّا يسهّل عملية استرجاع (recovery) المحفز الحيوي والمنتج (تحولات حيوية استخلاصية (Extractive bioconversions)). كذلك، يمكن تحقيق عطاءات مرتفعة من المنتج من خلال تخفيض إمكانية التثبيط من قِبل المركب الأولي أو المنتج ومنع التفاعلات الجانبية غيرالمرغوبة. وبالرغم من هذه الميزات لاستخدام المذيبات العضوية، فإن المحدوديات هي أيضاً موجودة. إذ يمكن أن يؤدي المذيب العضوي إلى انمساخ (Denaturation) أو تثبيط المحفز الحيوي، وأيضاً إلى زيادة تعقيد نظام عملية التفاعل.

لقد تم تطبيق نظم التفاعل هذه أولاً على عمليات تحويل أنزيمية قبل التوسع في استخدامهم في نظم الخلايا الكاملة. ومؤخراً، مع اكتشاف أنواع بكتيرية قادرة على النمو بوجود المحاليل العضوية، فإن ذلك جعل هذا الحقل في التحويل الحيوي

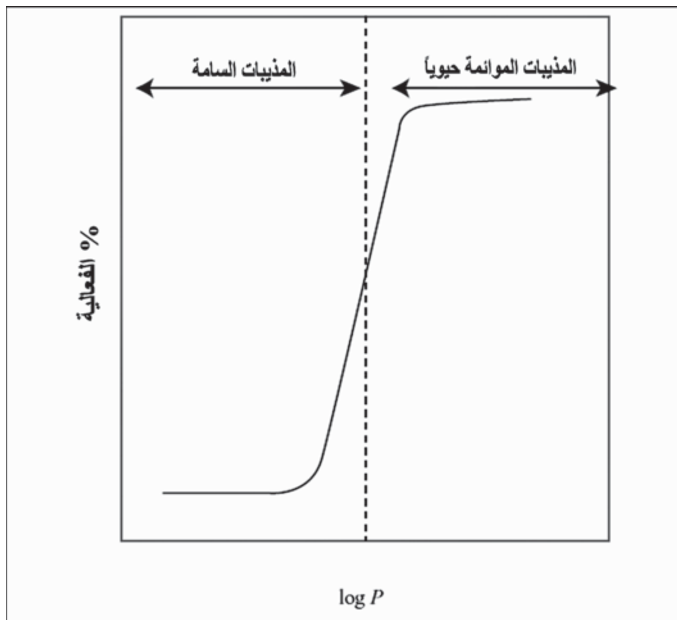
أكثر إشاراً، وهو ما يفسح المجال لإمكانات أكثر في فهم الآليات الكامنة وراء استجابات التحمل (Tolerance) أو التسمم لدى الكائنات المجهرية عند تعرضها للمذيات العضوية.

انتقاء المذيب Selection of solvent

يشكل الاسترجاع (Recovery) العالي للمنتج والمواءمة الحيوية معيارين من أهم المعايير التقنية لانتقاء المذيب العضوي (Organic solvent selection)؛ على الرغم من أن مواصفات أخرى، مثل الثباتية الكيميائية (Chemical stability) والحرارية (Thermal stability)، وانخفاض التوجه نحو تشكيل مستحلبات (Emulsions) في الأوساط المائية، وعدم التفكك الحيوي (Non-biodegradability)، والطبيعة غير الخطيرة وانخفاض سعرها، هي أيضاً مرغوبة.

في حين أن مواصفات أخرى مرغوبة للمذيب هي نسبياً شروط معتدلة، فإن تطلُّب التوافق الحيوي هو معيار تقييدي خاص. لقد تم القيام بعدة محاولات للربط بين سمّية (Toxicity) مختلف المذيبات وبعض الخصائص الفيزيائية–الكيميائية التي تمتلكها، إذ إن المعايير التي جرى استخدمها لتصنيف المذيبات من حيث مواءمتها الحيوية كانت تتعلق باستقطاب (Polarity) المذيب. قام لان (Laane) وزملاؤه في كلية الزراعة في جامعة واغنينجين (Wageningen) بوصف العلاقة المتبادلة بين الفعالية الحيوية (Bioactivity) ولوغاريثم مكافئ التفرق (Partition coefficient) للمذيب في النظام الثنائي الطور الأوكتانول (Octanol)/الماء (log P_{oct})، المعروف *بمعيار Hansch*. يرمز log P_{oct} إلى خاصية الكراهة (الطرد) للماء (Hydophobcity)، التي هي ليست نفسها بالضبط كالاستقطاب، ولكنها تبدي علاقة متبادلة أفضل مع معدلات التحفيز الحيوي من تلك التي تبديها النماذج الأخرى القائمة على استقطابية المذيب. يجري استخدام معيار Hansch حالياً في المجالات الطبية والدوائية كجزء من دراسة فعالية الدواء، ويمكن تحديدها تجريبياً أو حسابها عن طريق مقاربة ثابت Rekker للتشدف بالكراهة المائية (Rekker's hydrophobic fragmental constant approach). كما تم القيام بعدة محاولات لشرح العلاقة المتبادلة التجريبية (Empirical correlation) بين Log P_{oct}

واستبقاء فعالية المحفزات الحيوية الخلوية، ولكن حتى الآن لاتزال آليات السمية المسببة بالمذيب غير مفهومة جيداً.



الشكل 12.24: استبقاء مكافئ الفعالية الأنزيمية (enzyme coefficient activity) ضد log P.

لاحظ لان (Laane) وزملاؤه وجود علاقة متبادلة بين $Log\ P_{oct}$ وكلّ من فعالية تفاعل الإبوكسدة (Epoxiding reaction activity) للخلايا المثبتة وفعالية إنتاج الغاز للخلايا اللا هوائية(Anaerobic cells) في أوساط متنوعة مكونة من الماء ومذيبات عضوية مشبعة. عند رسم استبقاء الفعالية الخلوية ضد $log\ P_{oct}$ بيانياً، يتم الحصول على منحنيات سيغمويدية (ذات شكل S) (الشكل 12.24). وبذلك، تكون المذيبات مع قيمة $log\ P_{oct}$ أقل من نقطة الالتواء(Inflection point) عادةً سامة، بينما تلك التي تكون مع قيمة $log\ P_{oct}$ أعلى من نقطة الالتواء موائمة حيوياً، حيث تعتمد نقطة الالتواء في المنحنيات على الكائن المجهري المدروس. بشكلٍ عام، تكون المذيبات التي تمتلك $log\ P_{oct}$ أقل من 2 نسباً مذيبات مستقطبة غير مناسبة لنظم التحفيز الحيوي، بينما تختلف الفعالية الحيوية في المذيبات ذات $log\ P_{oct}$ بين 2 و4، أما عندما تكون المذيبات ذات $log\ P_{oct}$ أعلى من 4 فتكون مذيبات مرتفعة عدم الاستقطاب (Apolar) (الجدول 10.24).

الجدول 10.24: المذيبات الموائمة حيوياً (Biocompatible)

المذيبات		معيار Hansch (Log P)
الكحول		
الديكانول	(decanol)	4.0
الأنديكانول	(undecanol)	4.5
الدوديكانول (dodecanol)		5.0
كحول أولايل	(oleyl alcohol)	7.0
الإيثر		
ثنائي فينيل الإيثر	(diphenyl ether)	4.3
الأحماض الكربوكسيلية		
حمض الأولييك	(oleic acid)	7.9
الإستر		
بينتيل بينزويت	(pentyl benzoate)	4.2
إثيل ديكانويت	(ethyl decanoate)	4.9
بيوتيل أوليات	(butyl oleate)	9.8
ثنائي بيوتيل الفثالات	(dibutylphthalate)	5.4
ثنائي بيوتيل الفثالات	(dipentalphthalate)	6.5
ثنائي هيكسيل الفثالات	(dihexylphthalate)	7.5
ثنائي أوكتيل الفثالات	(dioctylphthalate)	9.6
ثنائي ديسيل الفثالات	(didecylphthalate)	11.7

الهيدروكربون		
هيبتان	(heptanes)	4.0
أوكتان	(octane)	4.5
نونان	(nonane)	1.
ديكان	(decane)	5.6
الأنديكان	(undecana)	6.1
الدوديكان	(dodecane)	6.6
التيتراديكان	(tetradecane)	8.8
الهيكسا ديكان	(hexadecane)	9.6

أشكال سيغمويدية مشابهة جرت ملاحظتها في تأثير المذيبات في الكائنات المجهرية؛ إلا أنه تم الحصول فيها على نقاط التواء مختلفة لدى مختلف الكائنات المجهرية، حيث يمكن أن يكون هذا بسبب الفروقات في خصائص غشائها الخلوي. وقد لوحظ أيضاً أن زيادة معدل إثارة محلول المفاعل تسبب تحول (انزياح) لمنحنى $\log P_{oct}$ إلى اليمين. هناك علاقة تبادلية جيدة تم إيجادها بين الفعالية الأيضية لكلّ من *Arthrobacter*، و*Acinetobacter* ، و*Nocardia* و *Pseudomonas* و$\log P_{oct}$ للمذيب؛ إلا أن الانتقال بين المذيبات السامة وغير السامة لوحظ في المجال 3− 5 من $\log P_{oct}$. قام ترامبر (Tramper) وزملاؤه باستكشاف العلاقة بين الفعالية الأيضية (metabolic ctivity) للخلايا التي تعرضت لتراكيز من المذيبات العضوية بنسبة 10% (حجم/حجم) وقيمها من $\log P_{oct}$ عند مختلف المجموعات المتماثلة من المذيبات. وقد وجدوا أن قيمة $\log P_{oct}$، التي تكون كل المذيبات ذات قيمةٍ أعلى منها غير سامةٍ، تختلف عند مختلف المجموعات المتجانسة: مثلاً *Arthrobacter* و*Nocardia* تتحملان الألكانول(Alkanols) مع $\log P_{oct}$ أعلى من 4، بينما تتحملان الفثلات (Phthalates) فقط عند $\log P_{oct}$ أعلى من 5.

لقد تم تقييم تأثير خصائص الغشاء الخلوي في قدرة الكائنات المجهرية لتحمل المذيب وذلك على البكتيريا سلبية الغرام والبكتيريا إيجابية الغرام. إن

البكتيريا سلبية الغرام، وخصوصاً الــPseudomonas ، بشكلٍ عام هي أكثر تحملاً للمذيبات العضوية من البكتيريا إيجابية الغرام، وربما يعود هذا الاختلاف إلى وجود الغشاء الخارجي في البكتيريا سلبية الغرام. يحتوي هذا الغشاء على البروتينات البنيوية الأساسية (Structural proteins)، والبروتينات الدهنية (Lipoproteins) وعديدات السكريات الدهنية (Lipopolysaccarides). وهناك نسبة من البروتينات الدهنية للغشاء الخارجي هي مرتبطة تشاركياً بطبقة البيبتدوغلايكان (Peptidoglycan)، التي يُعتَقد أنها تهدف لحماية الخلايا من الضغوطات البيئية. أما الخلايا النباتية فتُظهر حساسية أكثر لوجود المذيبات العضوية، كما تبين في المعلقات الخلوية لنبتة *Morinda citrifolia*، التي تمتلك مقيِّد المواءمة الحيوية $\log P_{oct}$ مساوٍ لــ5. وبالتالي، يعتمد الانتقال من المذيب السام إلى المذيب غير السام على نوع المحفز الحيوي الخلوي.

معايير أخرى للعلاقة مع المواءمة الحيوية للمذيب تم وصفها مؤخراً، خاصةً بالنسبة إلى تأثير المذيب في ثباتية الأنزيم. وهي تضم معيار *الانحلالية الثلاثية* الأبعاد(*Three-dimentional solubility parameter*) أو *المقدرة على الانمساخ* (*Denaturatin capacity*) الذي استُخدم لتوقع، مثلاً، تركيز المذيب العضوي الذي يلاحَظ عنده تعطل نصف الفعالية (half-inactivation).

تصنيف نظم التفاعل العضوية

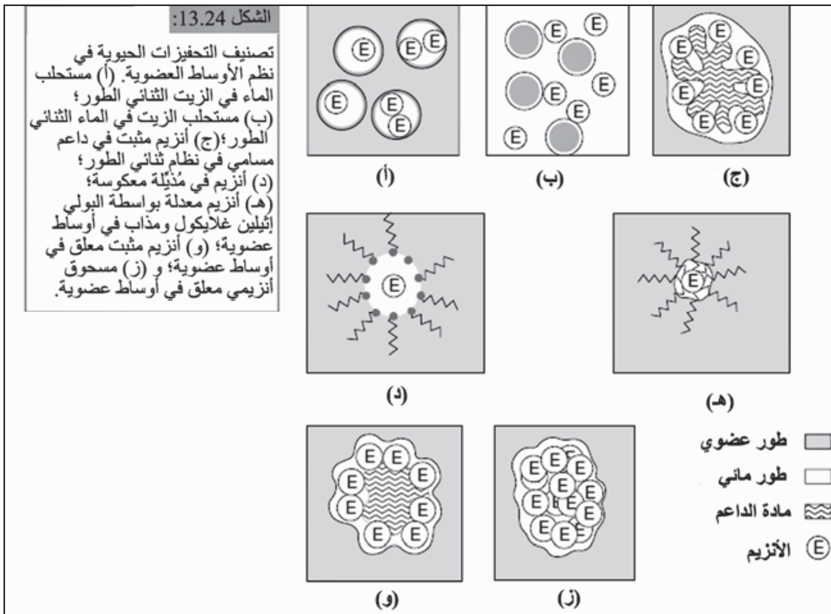
Classification of organic reaction systems

يمكن استخدام المحفزات الحيوية بطرق مختلفة على هيئة مندمجة مع المذيبات العضوية: (أ) مزيج متجانس من الماء والمذيبات القابلة للامتزاج مع الماء؛ (ب) نظم ذات طورين من السوائل المائية/العضوية؛ (ج) نظم دقيقة التغاير (مستحلبات دقيقة (Microemulsions) ومذيَّلات معكوسة (Reversed micelles)؛ (د) مسحوق أنزيمي ومحفزات حيوية مثبتة معلقة في المذيب من غير طور مائي؛ و(هــ) أزيمات معدلة تشاركياً منحلة في المذيب العضوي (الشكل 13.24 أ– ز).

مزيج متجانس من الماء والمذيبات القابلة للامتزاج مع الماء

Homogeneous mixture of water and water-miscible solvent

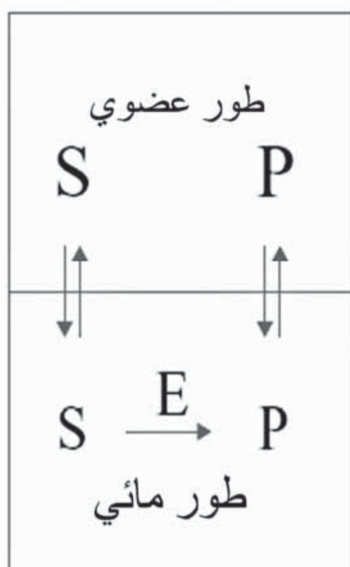
طريقة سهلة لزيادة انحلالية المركب الأولي الكاره (الطارد) للماء (hydrophobic) هي بإضافة مذيب عضوي ذي قابلية امتزاج مع الماء، كالميثنول (Methanol)، والأسيتون (Acetone)، وإثيل الأسيتات (Ethyl Acetate)، وثنائي ميثيل الفورماميد (Dimethyl formamide)، وثنائي ميثيل السلفوكسيد (Dimethlsulphoide)، ...إلخ، إلى وسط التفاعل. تمتاز هذه النظم بعدم إبدائها لمحدوديات انتقال الكتلة (Mass transfer limitations) بشكلٍ عام لكونها نُظُماً متجانسة. غير أن المحفز الحيوي عادةً ما يكون لديه بوجود هذه النظم ثباتية تشغيلية (Operational stability) ضعيفة، خاصةً عند الحاجة إلى تركيز عالٍ من المذيب. ويعود هذا إلى أن المذيبات الممتزجة مع الماء هي مركبات مستقطبة (Polar) ذات قيم Log P أدنى من 2، بحيث تُعتبر أنها مذيبات سامة. على سبيل المثال، يخضع أنزيم الريبونيوكلياز (Ribonuclease) المنحل في تراكيز متزايدة من 2-كلورو إثانول (2-cloroethanol) إلى انتقال من الحالة الطبيعية الأصلية إلى الشكل غير الملتف (Unfolded).



الشكل 13.24: تصنيف التحفيزات الحيوية في نظم الأوساط العضوية. (أ) مستحلب الماء في الزيت الثنائي الطور؛ (ب) مستحلب الزيت في الماء الثنائي الطور؛(ج) أنزيم مثبت في داعم مسامي في نظام ثنائي الطور؛ (د) أنزيم في مُذَيِّلة معكوسة؛ (هـ) أنزيم معدلة بواسطة البولي إثيلين غلايكول ومذاب في أوساط عضوية؛ (و) أنزيم مثبت معلق في أوساط عضوية؛ و (ز) مسحوق أنزيمي معلق في أوساط عضوية.

Aqueous/organic two phase systems نظم الطورين المائي/العضوي

تكون نظم الطورين السائلين(Two-liquid-phase) (مائي/عضوي) مفيدة عندما يجب توظيف متفاعلات (Reactants) ضعيفة الانحلال في الماء. يمكن أن يكون المذيب العضوي بحد ذاته هو المركب الأولي (مثل زيت الزيتون) الذي يجب تحويله أو كخزان (هيدروكربون Hydrocarbon) للمركب(ات) الأولي(ة) و/أو المنتج(ات)، (الشكل 13.24 أ، ب، ج و14.24). كما يمكن استخدام هذه النظم لحصر (تثبيت Immobilize) المحفز الحيوي فيزيائياً في الطور المائي في حين أن الطور العضوي يتم تجديده. في هذه النظم من المهم أن تكون مساحة السطح البيني كبيرة بشكل كافٍ لتحسين انتقال الكتلة. كما يمكن ضبط تفرق (Parititioning) المـــركـــب(ات) الأولي(ة) والمنتج(ات) في الطورين السائلين عن طريق اختيار المذيب المناسب و، في حالات معينة، كتلك التي تتضمن فصائل أيونية (مثـــل الأحـــمـــاض العضـــويـــة)، الرقـــم الهيدروجيني (Ph) (الذي يجب أن يكون أدنى من Pk_a الفصائل الأيونية للحصول على المركب بالشكل المُزال منـــه البروتـــون (Unprotonated compound) الذي يمكِّن من عملية إفرازه بسهولة) للطور المائي. في الحالة الأخيرة، يجب أن يكون الرقم الهيدروجيني أيضاً موائماً للفعالية الأنزيمية. وتكون تفرقة المركب(ات) الأولي(ة) والمنتج(ات) مناسبةً بشكلٍ خاص عندما يكون أحد أو سائر هذه المركبات مثبطاً للفعالية الأنزيمية، حيث إن تراكمه(ا) في الطور العضوي سيخفف من هذا التثبيط. يشكل الانزياح الإجمالي لتوازن التفاعل (Overall



الشكل 14.24:

مخطط توضيحي للتحويل الأنزيمي في نظام الطورين.
S، مركب أولي (substrate)؛ P، منتج (product)؛ E، أنزيم (enzyme).

(displacement of reaction equilibrium من خلال استخلاص المنتج ميزة أخرى لهذا النوع من النظام. إذ بالامكان تغيير نسبة الطور على مدى واسع، مما يؤدي إلى أمثلة مقدرة التفاعل. تضم تطبيقات نظم الطورين السائلين: إنتاج الإبوكسيد (Epoxide) [مثل (S)–ستيرين أوكسيد ((S)-styrene oxide)]، تحويل الستيرويد (Steroid transformation) (قطع السلسلة الجانبية للـــ Phyosterols، ونزع الهيدروجين–Δ^1 من الكورتيزول (Cortisol) ومشتقاته)، وإنتاج الكاتيكول (Catechol)، وتوليد تصنيع بيبتيد glycidylmethylester (2R,3S)-3-(p-methoxyphenyl) (وهو مركب وسيط لتصنيع الــDiltiazem)، وإنتاج الكارفون (Carvone)، وتحليل (Hydrolysis) زيت الزيتون، والتصميم الحركي لإستر الإبوبروفين (Ibuprofen ester) والنابروكسين (Naproxen) الراسيمي، وإنتاج المنكهات من الكيتون (Ketones)، وأكسدة الألكينات–N (n-alkanes)، واختزال الألديهايدات (aldehydes) إلى كحول أو أكسدة الكحول إلى ألديهايدات.

الأنظمة دقيقة التغاير Microheterogeneous systems

تمثل *المستحلبات الدقيقة* (*Microemulsions*) *والمُذيَّلات المعكوسة* (*Reversed micelles*) حالة خاصة من النظم سائلة الطورين بحيث لا يعود الطور المائي فيها قابلاً لأن يُميَّز ظاهرياً عن الطور العضوي. وتحتوي هذه النظم في العادة على مخفضات التوتر السطحي (Surfactants) من أجل تثبيت توزع الماء ومحتوياته في الطور العضوي المستمر.

إن *المُذيَّلات المعكوسة* هي تكتلات تشكلت بواسطة مخفضات التوتر السطحي في المذيبات عديمة الاستقطاب (Apolar). ومخفضات التوتر السطحي هي جزيئات متقابلة الزمر (Amphipathic) بحيث تمتلك سائر الأجزاء، المحبة للماء (Hydrophilic) والكارهة للماء (Hydrophobic) (الشكل 13.24 د). تكون الأذيال الكارهة للماء من مخفضات التوتر السطحي في تماس مع القسم عديم الاستقطاب من المحلول؛ وتتحول مجموعات الرؤوس المستقطبة (Polar) نحو

الداخل تجاه التكتل، لتشكيل نواة (جوهر) مستقطبة. يمكن لهذه النواة (الجوهر) أن تذوِّب الماء (التجمع المائي) وجزيئات المضيف الضخمة كالبروتينات. تضم مجموعة الجزيئات المتقابلة الزمر المستخدمة في تشكيل المُذَيَّلات المعكوسة داخل المذيبات الهيدروكاربونية (Hydrocarbon Solvents) كلّاً من دهون الغشاء الطبيعية ومخفضات التوتر السطحي الاصطناعية (الجدول 11.24).

يُشار عادةً إلى كمية الماء المنحلة في نظم المذيّلات المعكوسة بــw_0، وهي النسبة المولية (Molar ratio) لمخفض التوتر السطحي إلى الماء ($H_2O=w_0$/مخفض التوتر السطحي). هذا المعيار هو بالغ الأهمية، وذلك لأنه سوف يحدد عدد جزيئات المخفض لكل مُذَيَّلة، وتوافر جزيئات الماء من أجل إضافتها إلى بروتين، ومن أجل التحفيز الحيوي، كما أنه العامل الأساسي المؤثر في حجم المذيَّلة.

الجدول 11.24: أمثلة على مخفضات التوتر السطحي المُشَكِّلة للمذيلات المعكوسة

مخفض التوتر السطحي	المذيب
صوديوم داي أوكتيل سلفوسكسينات (AOT) (sodium dioctyl sulphosuccinate)	N–هيدروكاربون (C_6– C_{10}) (N-Hydrocarbon (C6–C10)) إزو أوكتان هيكسان حلقي (cyclohexane) كاربون رباعي الكلوريد (carbon tetrachloride) بينزين (benzene)
سيتيل تراي ميثيل أمونيوم برومايد (CTAB) (cetyltrimethylammonium bromide)	هيكسانول/أيزو أوكتان (hexanol/isooctane) هيكسانول/أوكتان (hexanol/octane) كلوروفورم/أوكتان (chloroform/octane)

ميثيل تراي أوكتيل أمونيوم كلورايد (TOMAC) (Methyltrioctylammonium chloride)	هيكسان حلقي
Brij 60	أوكتان
ترايتون X (triton)	هيكسانول/هيكسان حلقي
فوسفو فاتيديل كولاين	بينزين هيبتان
فوسفاتيديل إثيانولامين (phosphosphatidylethanolamine)	بينزين هيبتان

يعتمد تشكل المذيّلات المعكوسة بشكلٍ كبير على تغير الطاقة الراجع إلى التفاعلات المتبادلة ثنائية القطب (Dipoledipole interactions) بين مجموعات الرؤوس المستقطبة لجزيئات مخفض التوتر السطحي. يتم التعبير في أغلب الأحيان عن خصائص انحلالية (Solubilization) مخفض التوتر بواسطة رسم بياني مكون من ثلاثة أو أربعة أطوار، كما يتم تحديد المذيّلات المعكوسة من خلال مناطق الشفافية الضوئية. معظم العمل الذي يُنفّذ في نظم المذيلات المعكوسة يجري فيه استخدام السوديوم ثنائي الأوكتيل سلفوسكسينيت (AOT) (Sodium dioctyl sulphosuccinate)، وهو مخفض توتر سطحي أيوني ذو شحنة سلبية (Anionic). يشكل الــAOT تكتلات من المذيّلات مستقرة في المذيبات العضوية، كالأيزوأكتان (Isooctane) المذيب الأكثر استخداماً. تبلغ أقصى كمية للماء المنحل في نظام AOT/إيزوأوكتان/H_2O حوالى w_0=60، بحيث عند قيمة أعلى من هذه، يصبح محلول المذيّلة المعكوسة الشفاف مستحلباً عكراً، كما يحصل انفصال للطور.

لقد ذُكرت المحفزات الحيوية في المذيلات المعكوسة للمرة الأولى سنة 1978، ومنذ ذلك الحين جرى تناول العديد من الدراسات الأساسية والتطبيقات على المحفزات الحيوية في الكتب والمنشورات. تشتمل الأمثلة على هذا الموضوع على

ضبط تحليل الدهون والزيوت النباتية، والتصنيع الببتيدي بواسطة أنزيم البروتياز (Protease)، وتحطيم مبيدات الحشرات بتحفيز أنزيم هيدرولاز الفوسفور العضوي (Organophosphorus hydrolase)، والاختزال نوعي الفراغية-Stereo) specific) للبروجيستيرون (Progesterone) واختزال 2–هيبتانون -2) Heptanone) بواسطة أنزيمات نازعات هيدروجين الكحول Alcohol) dehydrogenases)، وتصنيع البينثيل فيروليت (Penthylferulate) المحفز بواسطة أنزيم إستيراز الفيرولويل (Feruloyl esterase)، وتفاعلات الإبوكسدة عديمة التناظر المرآتي (Chiral epoxidation) المحفزة بواسطة خلايا الــ *Mycobacterium* الكاملة المنحلة بالمستحلبات الدقيقة(Microemulsions)، وتصنيع قليلات السكريات الغالاكتية (Galactooligosaccharides) وألكيل الغلايكوزايدات (Alkyl glycosides) بتحفيز أنزيمات الغلايكوزيداز (Glycosidases). بالإمكان ضبط مستوى الماء الأمثل بواسطة قيمة النسبة المولية، w_0، التي تكون أكبر من 10 في تفاعلات التصنيع. تضم الأوجه الهامة حالياً للبحوث على هذه النظم القيام بزيادة ثباتية (Stability) المحفزات الحيوية وتطوير المفاعلات المناسبة لتحقيق استبقاء الأنزيم، وفصل المنتج وتجنب تلوُّثه جزيئات مفخفض التوتر السطحي.

نظم شديدة انخفاض الماء Very low water systems

من المفيد للعديد من عمليات التحويل الحيوي إنقاص كمية الماء في وسط التفاعل إلى حدٍّ كبير. لقد تمّت أول دراسة في هذا المجال سنة 1966 وبعدها توالت البحوث بشكلٍ واسع. فمن المعتقد أن استبقاء فعالية الأنزيم تعود إلى الكمية الدنيا من الماء الضرورية للحفاظ على بنية البروتين ووظيفته الأنزيمية. إن انتقاء المذيب العضوي هو دقيقٌ وحاسم لأن المذيب المحب للماء يقوم بإزالة الغشاء (القشرة) المائي(ة) الضروري(ة) عن جزيء الأنزيم. كما أن كمية الماء المربوطة بالأنزيم تتناقص بشكل كبير مع زيادة حُبيَّة المذيب للماء (Hydrophilicity). فعلى سبيل المثال إن تفاعلية الأنزيم ألفا–كيموتريبسين (α-chemotrypsin) في الأسيتون (Acetone) هي أعلى بــ10000 مرة من ما هي في البايريدين (Pyridine).

يمكن قياس كمية الماء في وسط التفاعل بعدة طرق. الطريقة الأكثر شيوعاً هي القيام بقياس تركيز الماء (بالنسبة المئوية الحجمية (% v/v) أو بالــ $mol\ l^{-1}$). غير أن هذا المعيار لا يبين شروط التفاعل للأنزيم. لذلك، فإن الطريقة الأفضل من ذلك لتحديد درجة ترطيب (إماهة) وسط التفاعل هي بأن تُستخدم فعالية الماء الديناميكية الحرارية (Thermodynamic water activity)، A_w، كمعيار. هذا المعيار، الذي يقيس كمية الماء في النظام، بإمكانه أن يحدد مباشرةً تأثيرات الماء في التوازن الكيميائي. يمكن لفعالية الماء أن تتغير خلال التفاعل، خاصةً إذا تم تشكيل الماء (تفاعلات الأسترة (Esterifications)) أو استهلاكها (تفاعلات التحليل (Hydrolysis)). لذلك، من المهم الحفاظ على فعالية الماء ثابتة من خلال ضبط تركيزها خلال التفاعل، مثلاً من خلال إضافة أملاح هيدراتية (إماهة) مباشرةً إلى وسط التفاعل، الذي يعطي فعالية مائية ثابتة تناسب عمليات التحويل الأنزيمية.

تتضمن النظم الشديدة انخفاض الماء استخدام الأنزيمات كمساحيق معلقة صلبة مثبتة على داعم، أو في مذيبات عضوية (الشكل 13.24 ز) أو مثبتة على شكل CLECs أو CLEAs؛ وأنزيمات معدلة تشاركياً (Covalently modified) قابلة للذوبان في أوساط عضوية (الشكل 13.24 هــ).

عند استخدام المساحيق الأنزيمية كمحفزات حيوية، فإنه من الممكن حدوث مشاكل بسبب تكتل جزيئات الأنزيم. والحل لهذه المشاكل يتجلى في تثبيت الأنزيم على داعم صلب مناسب، إذ يجب اختيار الداعم بحكمة وعناية مع الأخذ بعين الاعتبار خصائص سطحه، وهي القدرة على جذب الماء (Aquaphilicity)، لأن الماء في وسط التفاعل سوف يتوزع بين الأنزيم، والداعم ووسط التفاعل مما يؤثر في البيئة الدقيقة (Microenvironment) للأنزيم.

إن الميزة المثيرة جداً للمعلقات الأنزيمية في الأوساط العضوية هي ظاهرة *ذاكرة الرقم الهيدروجيني* (*Ph*). لقد لوحظ أن الأنزيمات المجفدة (Lyophilised) من الليباز (Lipases) والبروتياز (Proteases) وعدد من

أنزيمات الأكسدة والاختزال تبدي نفس قيم الرقم الهيدروجيني الأمثل في الأوساط العضوية والمحاليل المائية. وتعود هذه الظاهرة إلى حالة التأين (Ionization) الصحيحة للأنزيم من أجل التحفيز. كما لوحظ أيضاً أن الأنزيمات المعلقة في المذيبات العضوية تبدي نوعية (Specificity) معدَّلة للمركب الأولي مقارنة بتلك التي تبديها في الأوساط المائية، حيث يُنسَب هذا إلى العارض الفراغي (Steric hindrance) الذي يسببه فقدان حركة الشكل التكويني (Conformationl mobility) للأنزيم (اللبياز والبروتياز) في المذيبات العضوية، وإلى عدم قدرة المركب الأولي على نقل الماء من مواقع الربط الكارهة للماء لجزيئات الأنزيم في الأوساط العضوية.

بما أن إزالة الماء تخفض من حركة الشكل التكويني بشكلٍ كبير، فقد لوحظ، كما هو متوقع، أن عملية المسخ (Deaturation) بالحرارة قد انخفضت إلى حدٍّ كبير في الأنزيمات المعلقة (Suspended) في مذيبات عضوية.

هناك مقاربة لتحسين فعالية الأنزيمات في المذيبات العضوية تظهر من خلال استخدام السواغات (Excipients) أو الأملاح، المضافة إلى المحلول الأنزيمي المائي قبيل التجفيد، حيث تحسن هذه المضافات من الفعالية من خلال عدة آليات. تقوم مضافات، مثل المثبطات المنافسة أو نظائر المركب الأولي التي تتم إزالتها بعد التجفيد بواسطة الاستخلاص غير المائي، بإطلاق تغييرات مرغوبة في تكاوين الموقع الفعال (Active site) في الأنزيم والتي يُستبقى عليها في المذيبات العضوية بسبب صلابة الأنزيم المعززة. كما يمكن أن تنشأ الحماية بالتجفيد من خلال إضافة السوكروز (Sucrose) أو السوربيتول (Sorbitol)، والبولي إيثيلين غلايكول أو الإيثير الإكليلي (Crown ethers)، التي تمنع التغييرات في تكاوين البروتين خلال عملية التجفيد.

لقد جرى استخدام معلقات الأنزيمات الصلبة في المذيبات العضوية في عدد من التطبيقات التقانية الحيوية، مثل عملية توزيع الجزيئات التبادلي (Transesterification) للدهون والزيوت بواسطة أنزيمات اللبياز (Lipases)،

وهي عملية صناعية لتطوير ثلاثي أسيل الغليسيرول (Triacylglycerogs). والأمثلة الأخرى عن المحفزات الحيوية في أوساط قليلة الماء تضم: تفاعلات الأكسدة (Oxidation) والاختزال (Reduction) الأنزيمية، كالسلفدة غير المتناظرة (Asymmetric sulphoxidation) للسلفيدات العضوية المحفزة بأنزيم البيروكسيداز (Peroxidase)؛ أو الاختزال غير المتناظر للألديهايدات (Aldehydes) والكيتونات (Ketones) الراسيمية (Acemic) والأكسدة للكحول الثانوية الراسيمية بتحفيز أنزيم نازعة الهيدروجين من الكحول المأخوذ من كبد الحصان؛ أو إضافة الهيدروكسيل (Hydroxylation) بانتقائية ناحية (Regio-selective) وبوجود الأوكسيجين مع الفينول لتحويله إلى كاتيكول (Catechols) ونزع الهيدروجين لاحقاً، من خلال أنزيم أوكسيداز الكاتيكول.

وعلى الرغم من ميزات المعلقات الأنزيمية الصلبة في المذيبات العضوية، إلا أن هذه النظم هي محدودة بانتقال الكتلة. للتغلب على مقيِّدات الانتشار هذه، تم تعديل الأنزيمات تشاركياً (Covalently)، وذلك باستخدام غلايكول بولي الإثيلين لجعلها منحلة في المذيبات العضوية. وبذلك، لأن الأنزيم أصبح منحلاً في التفاعل، فليس هناك من مقيِّدات انتشار؛ ولكن، من أجل إعادة استخدام الأنزيم، فإنه لا بد من استرجاعه عن طريق ترسيبه من مزيج التفاعل بمذيب غير مستقطب كالهيكسان (Non-polar hexane). كما يوجد معوِّقات أخرى في هذا النوع من الأنزيم تتمثل في تعطل الأنزيم الذي قد يحصل خلال إجراءات استخراجه وفي مستحضراته التي لا تذوب إلا في عدد محدود من المذيبات، مثل الهيدروكربونيات العطرية (Aromatic hydrocarbons) والمكلورة.

2.6.24 أوساط التفاعل ذات الطور الغازي -phase reaction media

تقدم النظم الغازية – الصلبة الطور(Solid--gas-phase systems) عدة ميزات مقارنةً بالنظم الأخرى، أهمها تعزيز انحلالية (Solubility) المركبات الأولية والمنتجات. فالأنزيمات والعوامل المساعدة (Co-factors) هي أكثر ثباتية، كما أن استرجاع المحفز الحيوي من وسط التحويل هو أبسط. إضافة إلى ذلك، لا يشكل عادةً

انتقال الكتلة خطوةً محدِّدة لمعدل التفاعل العام (Overall rate- limiting step) لأن الانتشار في الغاز أكثر فعالية منه في المحلول السائل. ولأنه يتم استخدام درجات حرارة مرتفعة نسبياً (مثلاً 45-85°C)، فإنه يمكن تجنب تلوث المفاعل بالجراثيم.

إن الأنزيمات المستخدمة غالباً في التحفيز الحيوي الغازي- الصلب تضم على سبيل المثال نازعة هيدروجين الكحول (Alcohol dehydrogenase)، وأوكسيداز الكحول (Alcohol oxidase) وأنزيمات اللبياز (Lipases). تنخرط مثل هذه الأنزيمات في إنتاج المركبات الطيارة (Volatile compounds)، كالألديهايدات (Aldehydes)، والإسترات (Esters) والكيتونات (Ketones)، عبر توزيع الجزيئات التبادلي (الحلكلة (Alcoholysis))، وتفاعلات الأكسدة (Oxidation)، والاختزال (Reduction)، بشكلٍ رئيسي من أجل صناعة الأطعمة والعطورات. إن الأنزيمات المتَضَمَّنَة في تفاعلات الخزلدة (Redox reactions) هي معتمدة على العوامل المساعدة، ولأنها ثمينة ويجب تجديدها، فإن الخلايا الكاملة هي مقاربة جذابة لإتاحتها تجديد العوامل المساعدة. إلى جانب ذلك، غالباً ما تكون الأنزيمات النقية أقل ثباتية من حالة وجودهم في بيئتهم الخلوية الطبيعية، وعملية استرجاعهم وتنقيتهم عادةً ما تكون باهظة الكلفة. لذلك، لقد تم استخدام الخلايا المجففة من *Saccharomyces cerevisiae* من أجل اختزال الألديهايدات (Aldehydes) والكيتونات (Ketones) في المفاعلات الغازية–الصلبة المستمرة. وعلى نحوٍ مشابه، استُخدمت الخلايا المجفدة من *Rhodococcus erythropolis* لتحليل (Hydrolyse) 1–كلوروبيوتان (1- chlorobutane) إلى 1–بيتانول (1-butanol) في المفاعل الحيوي الغازي– الصلب، ضمن مثالٍ على مصداقية هذه المقاربة في المعالجة البيولوجية للمركبات العضوية الطيارة.

3.6.24 السوائل فوق الحرجة كأوساط تفاعل حيوية

Super-critical fluids as bioreaction media

تتطلب التفاعلات الأنزيمية في السوائل فوق الحرجة والقريبة من الحرجة نظماً مضغوطة. تسمح مثل هذه النظم بمعدلات انتقال (Mass transfer) عالية للكتلة وفصلاً سهلاً لمنتجات التفاعل. وبسبب خاصيته غير السامة وحرارته

الحرجة المنخفضة نسبياً (31°C)، فإنه يجري استخدام سائل ثاني أوكسيد الكربون فوق الحرج في أغلب الأحيان. هناك العديد من التحويلات الحيوية التي تم إنجازها بشكلٍ كامل باستخدام ثاني أوكسيد الكربون فوق الحرج، وهي: أكسدة الكوليستيرول بأنزيم أوكسيداز الكوليستيرول (Cholesterol oxidase)، التحليل ذو الانتقاء الفراغي (Stereo-selective hydrolysis) لغليسيديل البيوتارات الراسيمي (Racemic glycidyl butarate) بليباز (Lipase) *Rhizomucor miehei* المثبت من أجل إعطاء R(−) غليسيديل البيوتارات (Homochiral R(-) glycidyl butyrate) المتجانس التناظر المرآتي، تصنيع البولي إستر المفتوح (Aliphatic polyesters) المحفز بالليباز من خلال البلمرة بفتح حلقة اللاكتونات (Lactones) والتكثيف المتعدد (Polycondensation) لدِفِنيل الإستر (Divinyl esters) والغلايكول (Glycols)، تحطيم البولي إستر المحفز بالليباز من أجل إعطاء قليلات الوحدات (Oligomers)، توزيع الجزيئات التبادلي (Transesterification) بين N−حمض البيوتيريك (N-buteric acid) والإثانول باستخدام أنزيمات الليباز، أسترة حمض الأولييك (Oleic acid) بوجود أولييل الكحول (Oleyl alcohol) وباستخدام الليباز المثبت، التصنيع المحفز بالليباز للسانسيكرين القائم على ثلاثي الأولِيين (Triolein-based sunscreens)، توزيع الجزيئات التبادلي بين ثلاثي الأولِيين وإثيل البيهينات(Ethyl behenate) بواسطة الليباز المثبت، تصنيع ثنائي البيبتيد بواسطة معقدات ألفا−كيموتريبسين (α-chemotrypsin) المغشّاة بمخفض التوتر السطحي (Surfactant)، وتحليل زيت دوار الشمس بواسطة الليباز في مفاعل الغشاء المستمر. تُثبِت خاصية عدم استقطاب ثاني أوكسيد الكربون (CO_2)، التي تذوِّب تفضيلياً المركبات الكارهة للماء، بأنها صفة مقيِّدة لاستعمالها، بالرغم من تطوير مخفضات توتر سطحي جديدة تسمح بانحلالية كلٍّ من المواد المحبة للماء والكارهة له في ثاني أوكسيد الكربون والتغلّب على هذا المعوِّق. كما يمكن تحسين انحلالية بعض المركبات بإضافة كميات قليلة من المذيبات المساعدة (Co-solvens)، المعروفة بالمُقِلات (Entrainers). فعلى سبيل المثال، جرى استخدام الميثانول ($3.5\%\ mol\ mol^{-1}$)

كمُقِل لتعزيز انحلالية الكوليستيرول في ثاني أوكسيد الكربون فوق الحرج. ومن ضمن محدودياته أيضاً، يمكن لثاني أوكسيد الكربون فوق الحرج بين الحين والآخر أن يقوم بإزالة القشرة المائية الضرورية عن سطح الأنزيم ما يؤدي إلى تعطيله (Deactivation). لذلك، تم استخدام البروبان القريب من الحرج (Near-critical propane) لتجاوز مثل هذه المعوّقات، في عمليات توزيع الجزيئات التبادلي بين N–حمض البيوتيريك والإثانول. كما جرى استخدام CLECs المعلقة بالإيثان فوق الحرج، من أجل تفاعلات توزيع الجزيئات التبادلي والتحليل، بالإضافة إلى تقييم عدة غازات مضغوطة أخرى (Freon R23)، البيوتان، ثنائي ميثيل الإيثر والكبريت سداسي الفلوريد (Sulphur hexachloride). يكمن العائق الأساسي في مثل هذه النظم في تطلبها للطاقة المرتفع وكلفة تجهيزاتها بسبب استخدام الضغط العالي فيها.

4.6.24 المحفزات الحيوية في السوائل الأيونية

Biocatalysis in ionic liquids

إن السوائل الأيونية هي سوائل لا تتبلور على درجة حرارة الغرفة. وهي تتألف إما من أيون 1,3– ثنائي الألكيل إميدازوليوم ذو الشحنة الإيجابية (1,3-dialkylimidazolium cation) أو أيون N– ألكيل بايريدينيوم ذوالشحنة الإيجابية (N-alkylpyridinium cation)، مع أيون غير مساوٍ ذي شحنة سلبية، مثل BF_4^-، BF_6^- أو NO_3^-. لقد كان من المتصوَّر أن مثل هذه المواد الكيميائية هي كالاستعاضات الخضراء (Green replacements) للمذيبات العضوية. فهي لا تمتلك ضغط بخار (Vapor pressure)، ومستقرة حرارياً (Thermally stable)، كما يمكن ضبط استقطابها (Polarity) وكراهيتها (طردها) للماء (Hyrophobicty) وامتزاجيتها بالمذيب كما ينبغي من خلال التعديلات المناسبة للأيون الإيجابي الشحنة أو السلبي الشحنة. عادةً ما تبقى الأنزيمات فعالة بوجود السوائل الأيونية، وذلك لعدم ذوبانها بل لبقائها معلقة كمسحوق. هناك مجموعة جديرة بالاعتبار من أنواع الأنزيمات، باستثناء أنزيمات الليباز بشكلٍ خاص، هي فعالة تحفيزياً بوجود السوائل الأيونية. إن قابلية استخدام هذه المذيبات في أوساط التحويل الحيوي تمكّن من استخدام

تراكيز مرتفعة من المركبات الأولية المستقطبة (مثل السكر والفيتامينات). وهذا بدوره يؤدي إلى تفاعلات سريعة وعطاءات إنتاج عالية.

يمكن تعزيز الثباتية الحرارية للأنزيمات، كأنزيمات الليباز، عند وجودها في السوائل الأيونية، وذلك ربما بسبب تعزيز تكوينات فعالة (Active conformations) أكثر للأنزيم. كما يمكن أيضاً تعزيز (الــ)انتقائية (المصاوغة المرآتية) مقارنة بالأوساط التقليدية. بالرغم من أن التحفيز الحيوي في الأوساط الأيونية قد ركّز بشكل أساسي على استخدام الأنزيمات، إلا أن الخلايا الكاملة من *Rhodococcus* B312، وخميرة الخبز والــ*E. coli* تحافظ أيضاً على فعاليتها في مثل هذه الأوساط، ربما لأن السوائل الأيونية هي أقل إيذاءاً للأغشية الخلوية من المذيبات العضوية.

الجدول 12.24: بعض الأمثلة على المحفزات الحيوية المستبقية لفعاليتها في السوائل الأيونية

المحفز الحيوي	التفاعل
أنزيمات الإستيراز (esterases)	توزيع الجزيئات التبادلي (transesterification)
أنزيمات الغلايكوزيداز هيدراتاز (glycosidases hydratases)	تصنيع الكربوهيدرات
Rhodococcus B312	إضافة الماء إلى 1,3–داي سيانوبينزين (1,3-dicyanobenzene)
أنزيمات الليباز (lipases)	انحلال الكحول (alcoholysis) تصنيع الأميد (amide) الأسترة Perhydrolysis تصنيع البولي إستر توزيع الجزيئات التبادلي
أنزيمات البروتياز	

الثيرمولايزين (thermolysin)	تصنيع بيبتيدي
ألفا–كيموتريبسين (α- chemotrypsin)	توزيع الجزيئات التبادلي
سابتاليزين (subtalisin)	تحليل ذو انتقاء فراغي (stereo-selective hydrolysis)
نظم الخزلدة (redox systems)	
خميرة الخبز	اختزال الكيتون
نازعة هيدروجين الفورمات (formate dehydrogenase)	تجديد الـــ NADH_
لاكاز (laccase)	أكسدة الـــ syrringaldazine_
بيروكسيداز (peroxidase)	أكسدة الـــ guaiacol_

الأمثلة على المحفزات الحيوية التي هي فعالة في السوائل الأيونية مقدمة في الجدول 12.24. على الرغم من ميزاتها العديدة، فإن هذه المذيبات تُظهر بعض المحدوديات، التي من بينها اللزوجة العالية، وعمليات استرجاعها وتنقيتها المعقدة، وصعوبة ضبط فعالية الماء والرقم الهيدروجيني (pH) فيها.

7.24 الملاحظات المُستنتَجة Concluding remarks

تم في هذا الفصل وصف استخدام المحفزات الحيوية وأدائها في عمليات التحويل الحيوي المتعلقة بكل من التطبيقات الصناعية، والتحليلية والطبية الحيوية وبالمعالجة الحيوية للبيئة.

من حيث العملية، هناك ميزات ومعوقات لكل من المسارات الكيميائية والكيميائية الحيوية. لقد تم حل جزء من محدوديات مسار التحفيز الحيوي عبر التطويرات الجديدة في مجالات علم الأحياء، والكيمياء وهندسة العملية. كما أن

التطورات في تقنية تأشيب الــ DNA، والهندسة الأيضية، وعمليات التخمير والتحفيز الحيوي في أوساط غير تقليدية قد وسّع أيضاً من تطبيقات (استعمالات) المحفزات الحيوية إلى عمليات تحويل حيوية تصنيعية وتأكسدية/اختزالية (Oxidative /reductive). من المهم التشديد هنا على التكامل بين العمليات والمجالات (الهندسة، وعلم الأحياء والكيمياء)، الذي هو سمة أساسية من أجل تطوير مسارات تحفيز حيوي منافِسة. كما أن هناك تطبيقات جديدة للمحفزات الحيوية (الطبيعية أو المعدلة) في حقول الكيمياء التصنيعية، والطبية الحيوية (حساسات حيوية)، وتحليل البيئة من المتوقع إنجازها مسقبلاً.

8.24 قراءات إضافية — Further readings

Van Beilen, J. B., and E. G. Funhoff, “Expanding the Alkane Oxygenase Toolbox: New Enzymes and Applications,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 16 (2005), pp. 308-314.

Breuer, M. and B. Hauer, “Carbon-Carbon Coupling in Biotransformation,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 14 (2003), pp. 570-576

Burton, S. G. “Oxidizing Enzymes as Biocatalysts,” *Trends in Biotechnology*, vol. 21 (2003), pp. 543-549.

Burton, S. G., D. A. Cowan, and J. M. Woodley, “The Search for the Ideal Biocatalyst,” *Nature Biotechnology*, vol. 20 (2002), pp. 37-45.

Cao, L. “Immobilised Enzymes: Science or Art?,” *Current Opinions in Chemical Biology*, vol. 9 (2005), pp. 217-226.

Cao, L., L. van Langeny, and R. A. Sheldon, “Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free?,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 14 (2003), pp. 387-394.

Gavrilescu, M. and Y. Chisti, “Biotechnology-A Sustainable Alternative for Chemical Industry,” *Biotechnology Advances*, vol. 23 (2005), pp. 471-499.

Gill, I. and A. Ballesteros, “Bioencapsulation Within Synthetic Polymers. 1: Sol-Gel Encapsulated Biologicals,” *Trends in Biotechnology*, vol. 18 (2000), pp. 282-296.

Ishige, T., K. Honda, and S. Shimizu, “Whole Organism Biocatalysis,” *Current Opinions in Chemical Biology*, vol. 9 (2005), pp. 174-180.

Krishna, S. H. “Developments and Trends in Enzyme Catalysis I in Non-Conventional Media,” *Biotechnology Advances*, vol. 20 (2002), pp. 239-266.

Müller, M. “Chemical Diversity through Biotransformations,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 15 (2004), pp. 591-598.

OECD, *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*. Paris: OECD Publications, 2001.

Schmid, A., J. S. Dordick, and B. Hauer [et al.], «Industrial Biocatalysis: Today and Tomorrow,” *Nature*, vol. 409 (2001), pp. 258-268.

Schmid, A., F. Hollmann, J. B. Park, and B. Bühler, “The Use of Enzymes in the Chemical Industry in Europe,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 13 (2002), pp. 359-366.

Straathof, A. J. J., and P. Adlercreutz (eds.), *Applied Biocatalysis*, 2nd ed. Switzerland: Harwood Academic, 2000.

Szczebara F. N., C. Chandelier, and C. Villeret [et al.], Total Biosynthesis of Hydrocortisone from a Single Carbon Source in Yeast,” *Nature Biotechnology*, vol. 21 (2003), pp. 143-149.

Turner, N. J. Directed Evolution of Enzymes for Applied Biocatalysis,” *Trends in Biotechnology*, vol. 21 (2003), pp. 474-478.

Van Beilen, J. B. and Z. Li, “Enzyme Technology: An Overview,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 13 (2002), pp. 338-344.

Van Der Donk, W. A. and H. Zhao, “Recent Developments in Pyridine Nucleotide Regeneration,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 14 (2003), pp. 421-426.

Zhao, H., K. Chockalingam, and Z. Chen, “Directed Evolution of Enzymes and Pathways for Industrial Biocatalysis,” *Current Opinions in Biotechnology*, vol. 13 (2002), pp. 104-110.

الفصل الخامس والعشرون

التطبيقات الكيميائية المناعية

Immunochemical Applications

مايك كلارك **Mike Clark**

جامعة كمبريدج، المملكة المتحدة **University of Cambridge, UK**

مسرد بالكلمات ومعانيها

المواد المساعدة Adjuvants: هي مواد عندما تُخلط مع مستضد تزيد استمناعه، أي أنها تعزز الاستجابة المناعية. فهي تُسبب التهابات وتهيجات، كما تساعد على تنشيط خلايا الجهاز المناعي.

الألفة Affinity: ثابت ربط الجسم المضاد بالمستضد الذي تم قياسه عند التوازن.

التمنيع الأسوي Alloimmunisation: تمنيع الحيوان بخلايا أو أنسجة مشتقة من حيوان آخر من نفس النوع، بحيث يكون هناك اختلافات في أليلات alleles الجينات فيهما.

الجسم المضاد Antibody: بروتينات تكيُّفية ذات ربط نوعي (تخصصي) بالمستضد موجودة في بلازما الشخص المنيع (وتدعى بالغلوبولين المناعي).

المستضد Antigen: هو جزيء، أو مركب من الجزيئات، يُدرَك من قبل الجسم المضاد (الغلوبولين المناعي) بواسطة ربطه بالمنطقة المتغيرة منه.

الخلايا العارضة للمستضد Antigen-presenting cells (APC): وهي خلايا متخصصة (الخلايا المتشجرة dendritic، خلايا البلعمة الكبيرة macrophages) باستطاعتها ابتلاع، تحطيم ثم عرض أجزاء من الكائنات الممرضة ومستضدات أخرى على سطحها لخلايا الجهاز المناعي الأخرى (مثل، الخلايا البائية والخلايا التائية).

المناعة الذاتية Autoimmune: المناعة تجاه جزيئات (مستضدات) داخل جسم الحيوان نفسه التي بإمكانها أن تؤدي إلى مرض، مثلاً التهاب المفاصل الريثاني، أو بعض أشكال مرض السكري.

الشره Avidity: وهو المصطلح للأُلفة الفعالة الناتجة من تفاعل الأجسام المضادة مع المستضد باستخدام مواقع الربط بالمستضد المتعددة والذي هو عمل معقد من ألفات الربط الفردية.

الخلايا البائية B-cells: هي مجموعة ثانوية من الخلايا البيضاء (الليمفاويات) في الدم التي تنتج الأجسام المضادة.

مناطق تحديد المتمم (1، و2 و3) Complimentarity Determining Regions (CDR (1,2 and 3)): وهي مناطق موجودة في القطاعات ذات المنطقة المتغيرة من الغلوبولين المناعي، التي تشكل التفاعل المتبادل الرئيسي مع المستضد. من الناحية البنيوية، تشكل مناطق تحديد المتمم حلقات على نهاية واحدة من القطاع الكروي للجسم المضاد.

الجسم المضاد الكيميري Chimaeric antibody: هو جسم مضاد اصطناعي مُحضر من خلال تقنية تأشيب الـــ DNA بحيث يتم استبدال قطاعات من أحد الأجسام المضادة بقطاعات من أجسام مضادة أو بروتينات أخرى.

الصنف Class: هو النوع أو التصنيف الرئيسي للغلوبولين المناعي، مثلاً الغلوبولين المناعي M، الغلوبولين المناعي G، الغلوبولين المناعي A أو الغلوبولين المناعي E

المتممات Complement: هي سلسلة أنزيمات مُحفَّزة ذاتياً توجد في بلازما الدم، تتم إثارتها من قبل المركبات المؤلفة من الجسم المضاد والمستضد مما يؤدي إلى تحطيم وإزالة المستضد.

القطعة D-segment D: قطعة التنوع Diversity segment، وهي قطعة جين موجودة في السلسلات الثقيلة للغلوبولين المناعي والتي أُعيد ترتيبها بين قطعة V وقطعة J.

وظائف المستجيب (العضو المؤثر) Effector functions: تُثار وظائف المناعة من خلال الربط النوعي للجسم المضاد بالمستضد. وهي تضم المتممات في البلازما ومستقبلات Fc (مستقبلات الشدفة المتبلورة) الموجودة على العديد من أنواع الخلايا المختلفة.

الحاتمة Epitope: هي موقع واحد من الربط بالجسم المضاد الموجود على المستضد. أي مستضد يمكن أن يرتبط بأجسام مضادة مختلفة من خلال حواتم مختلفة.

ELISA: المعايرة المناعية الممتزة المتصلة بالأنزيم Enzyme Linked Immunoadsorbant Assay، وهي نظام معايرة شائع الاستخدام بحيث أن الجسم المضاد موصول تشاركياً بأنزيم، وبذلك من الممكن استخدام تحول المركب الأولي لقياس كمية الأجسام المضادة المربوطة.

Fab: شدفة الربط بالمستضد Antigen -binding fragment، وهي شدفة من الغلوبولين المناعي، ناتجة جراء التحلل البروتيني (Proteolytic) للجسم المضاد، ترتبط بالمستضد.

$F(ab')_2$: شدفة من الغلوبولين المناعي، ناتجة جراء التحلل البروتيني للجسم المضاد، بحيث أن شدفتي ربط بالمستضد (Fab) لا تزالان مرتبطتين عند المفصل.

Fc: الشدفة المتبلورة Crystallisable fragment، وهي شدفة من الغلوبولين المناعي ناتجة جراء التحلل البروتيني للجسم المضاد. تحتوي هذه الشدفة أيضاً على تسلسلات مطلوبة في التفاعل المتبادل وفي إثارة عمل المستجيب (العضو المؤثر).

مستقبل Fc: مستقبل الشدفة المتبلورة، وهو مركب جزيئي بروتيني مُعبَّر عنه على سطح الخلية، بإمكانه الارتباط بشكلٍ نوعي (متخصص) والتعرف على تسلسلات في الشدفة المتبلورة في الغلوبولين المناعي.

FR (1، 2، 3، و4): مناطق الهيكل Framework regions، وهي أربع مناطق محفوظة جزئياً من التسلسل داخل قطاعات المنطقة المتغيرة من الغلوبولين المناعي. بنيوياً، تشكل مناطق الهيكل الجديلة β المضادة التوازي والمحفوظة من قطاعات البروتين.

شُدَف Fv: وهي المكوّن الأدنى للغلوبولين المناعي الذي لا يزال قادراً على الربط بالمستضد. تتألف من قطاعات السلسلة الخفيفة والثقيلة المتغيرة.

الهابتن Hapten : وهو جزيء صغير يمكن أن يتعرف عليه الجسم المضاد إلا أنه غير مستمنع بحد ذاته. لذلك يجب أن يكون مقترناً تشاركياً بحوامل بروتنية من أجل استخدامه في التمنيع.

الأجسام المضادة المؤنسنة: وهي أجسام مضادة ناتجة من استبدال تسلسلات من أجسام مضادة وحيدة النسيلة مستمدة من القوارض بسلاسل مثيلة بشرية وذلك من أجل تخفيف استمناع هذه الأجسام في جسم المريض. بالإمكان القيام بذلك أيضاً على مناطق الهيكل داخل قطاعات المنطقة المتغيرة لإعطاء الجسم المضاد "المؤنسن كاملاً" أو "المعاد تشكيله".

الخلايا الورمية الهجينة Hybridoma cells: وهي خلايا ناتجة من دمج خلايا بائية من طحال حيوانات ممنعة مع خلايا النخاع الورمية المكيَّفة للنمو في مزرعة خلوية، وذلك من أجل انتاج خطوط خلوية طويلة أمد الإفراز لجسم مضاد نوعي واحد.

اللاصقات المناعية Immunoadhesins: وهي بروتينات مندمجة تُولَّد بواسطة تقنية الـــDNA المأشوب، بحيث تُنتَج كجزيء مهجّن خيميرياً مع منطقة الشدفة المتبلورة Fc region من الغلوبولين المناعي.

مركب (معقَّد) المناعة: وهو مركب من الأجسام المضادة المرتبطة بمستضداتها.

استمناعي: هو شكل من المستضد القادر على توليد إستجابة مناعية عندما يتم حقنه أو اعطاؤه للحيوان.

الغلوبولين المناعي Immunoglobulin: قسم من غلوبولين البلازما الذي يحتوي على بروتينات مناعة نوعية (محددة) تدعى أجسام مضادة.

الترسيب المناعي Immunoprecipitation: وهو استخدام الأجسام المضادة لإزالة المستضد من المحلول، وذلك من خلال تشكيل مركبات مناعة غير منحلة أو مقيدة الحركة.

الكبت المناعي Immunosuppress: وهو لتخفيض أو كبت قدرة الحيوان على تفعيل الاستجابة المناعية. في بعض الحالات يمكن أن يكون هذا مرغوباً ومن الممكن تحقيقه من خلال استخدام أدوية أو أجسام مضادة نوعية (انتقائية) لخلايا تنظيمية في جهاز المناعة. أما في حالات أخرى فقد يكون حصوله غير مرغوب فيه وذلك في بعض الأمراض، كما في متلازمة نقص المناعة المكتسبة AIDS الناتجة من الإصابة بفيروس نقص المناعة البشرية HIV.

سلسلة–J: وهي وحدة "انضمام joining" بروتينية فرعية متحدة تشاركياً، من خلال روابط ثنائية الكبريت، بغلوبولينات مناعية متعددة الأجزاء multi-meric كالغلوبولين المناعيA (IgA) الثنائي الأجزاء والغلوبولين المناعيM (IgM) الخماسي الأجزاء. ويجب ألّا يختلط الأمر بين سلسلة– J والصوت المشابه قطعة–J (انظر أدناه).

قطعة–J: وهي قطعة الوصل أو الانضمام من الــDNA المعاد ترتيبها مع قطعة–V لسلاسل غلوبولين المناعة الخفيفة، أو مع قطع–V و–D لسلاسل غلوبولين المناعة الثقيلة، من أجل إعطاء المنطقة المتغيرة (V-region) الكاملة من الغلوبولين المناعي.

MHC I وMHC II: الصنف I والصنفII من مركبات التوافق النسيجي الرئيسية، وهي جزيئات على سطح الخلية تُستَخدم لعرض شدف بيبتيدية من المستضد للمستقبل الموجود على الخلية التائية.

الأجسام المضادة وحيدة النسيلة (Monoclonal antibodies): هذا المصطلح يُطلق على جسمٍ مضاد منتج من خط خلوي نسلي في مزرعة النسيج. وهو جسمٌ مضاد معرّف جيداً ويمكن التنبؤ بخصائصه، بخلاف المزائج المعقدة من الأجسام المضادة الموجودة في بلازما الحيوانات.

الأمصال المضادة عديدة النسيلة (Monoclonal antisera): يُستخدم هذا المصطلح للتمييز بين المزيج المتغاير الموروث من الأجسام المضادة الموجودة في أمصال الحيوانات الممنعة والأجسام المضادة وحيدة النسيلة المحضرة مخبرياً.

الصنف الفرعي Sub-class: وهو التصنيف الفرعي للغلوبولين المناعي داخل الصنف المعطى، مثل الغلبولينات المناعية G1، G2، G3، وG4 هي جميعها أجسام مضادة من الصنف الفرعي للغلوبولين المناعي G (IgG).

ScFv: شدفة Fv المنفردة السلسلة single chain Fv fragment، وهي منشأ وراثي اصطناعي بحيث أن وصلة عديدة البيبتيد تم إدخالها بين النهاية الأمينية لقطاع منطقة متغيرة واحد والنهاية الكربونية لقطاع منطقة متغيرة آخر.

النوعية (Specificity): إن نوعية (تخصص) الجسم المضاد هي القدرة على إظهار قدر من الاختلاف في ربط الشره بين مستضدات مختلفة. فهي إذاً مصطلحٌ نسبي من حيث المعنى، أي أن الجسم المضاد هو نوعي (متخصص) تجاه "المستضد أ" ولكن ليس تجاه "المستضد ب". وبذلك يسمى الجسم المضاد هذا بـــ *المضاد- أ*.

الخلايا التائية T-cells: هي مجموعة فرعية من الخلايا البيضاء (اللمفاويات) في الدم التي تقوم إما بقتل الخلايا المصابة أو بمساعدة الخلايا الأخرى، كالخلايا البائية حتى تستجيب لمستضد ما.

المنطقة-Variable region V: وهي المنطقة المتغيرة من الغلوبولين المناعي.

V_H: وهو قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الثقيلة (Heavy chain) للغلوبولين المناعي

V_L: وهو قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الخفيفة (Light chain) للغلوبولين المناعي

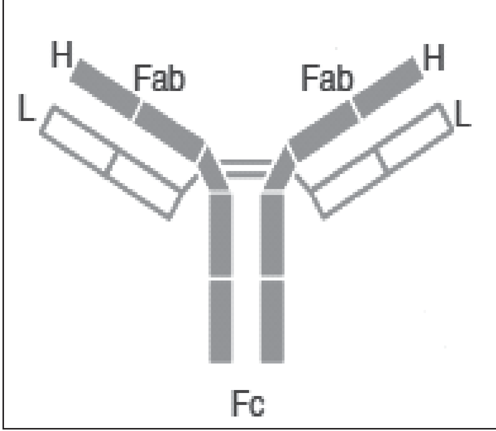
القطعة-V: وهي قطعة جين مُعاد ترتيبها لإعطاء منطقة فاعلة في الغلوبولين المناعي.

التمنيع التهجيني Xenoimmunisation: تمنيع نوع species من الكائنات بخلايا أو أنسجة من أنواع كائنات أخرى.

1.25 المقدمة Introduction

هذا الفصل سوف يناقش التطبيقات الكيميائية المناعية في أسس التقانة الحيوية، وبذلك سيتم التركيز فيه على تحدُّر(اشتقاق) وتطبيقات الأجسام المضادة المعروفة بطريقةٍ أخرى كغلوبينات مناعية (Ig). سميت هذه البروتينات هكذا بسبب الطريقة التي تم فيها اكتشافها. فقد تم تعريفها أولاً كقسم محدد من بروتين الغلوبولين في الدم، والتي كانت تُدعى غلوبولين غاما. وبسبب التعرف لاحقاً على أن هذا القسم البروتيني هو مكوِّن محدد واساسي في رد الفعل المناعي، فقد كان يُدعى أيضاً بالغلوبولين المناعي. إن المصطلح "مضاد الجسم" يعود إلى الحقيقة بأن هذه البروتينات تتعرف أو أنها نوعية ("مضادة") لــ"الأجسام الغريبة". إن الأجسام المضادة هي مهمة في التقانة الحيوية بسبب سهولة إمكانية استثمار قدرة جهاز المناعة لتوليد مجتمع متنوع من الغلوبولينات المناعية ذات نوعية (تخصصية) للربط بمدى واسع من البُنيات الجزيئية المختلفة التي ندعوها مستضدات، ما يعني أنه يتم التعرف على الأجسام الغريبة بواسطة الأجسام المضادة.

ومن أجل وصف هذه التطبيقات، فإنه من الضروري أن يكون القارئ لديه بعض أسس المعرفة حول علم الأحياء المناعية المتعلق بإنتاج الجسم المضاد وبنية ووظيفة الغلوبولين المناعي. سوف تُقدم هنا لمحة عامة مختصرة ومبسطة عن هذا الموضوع، إلا أنه يجب ملاحظة أن جهاز المناعة قد تم التطرق إليه لاقتضاء كونه معقداً جداً في تنظيمه، و يُنصح القارئ المهتم بالنظر في تفسيرات مفصلة وتامة أكثر مقدمة في كتب علم المناعة العديدة والمتوفرة بشكلٍ واسع (انظر قائمة القراءات الإضافية).



الشكل 1.25: بنية غلوبولين المناعة IgG الأساسية المؤلفة من سلسلتين ثقيلتين (بالأسود) وسلسلتين خفيفتين (بالأبيض). السلسلتان الثقيلتان مربوطتان مع بعضهم البعض برباط ثنائي الكبريت، وكل سلسلة خفيفة هي مربوطة بسلسلة ثقيلة بواسطة رباط ثنائي الكبريت. الجسم المضاد لديه أيضاً منطقتا ربط بالمستضد (Fab) ومنطقة Fc واحدة.

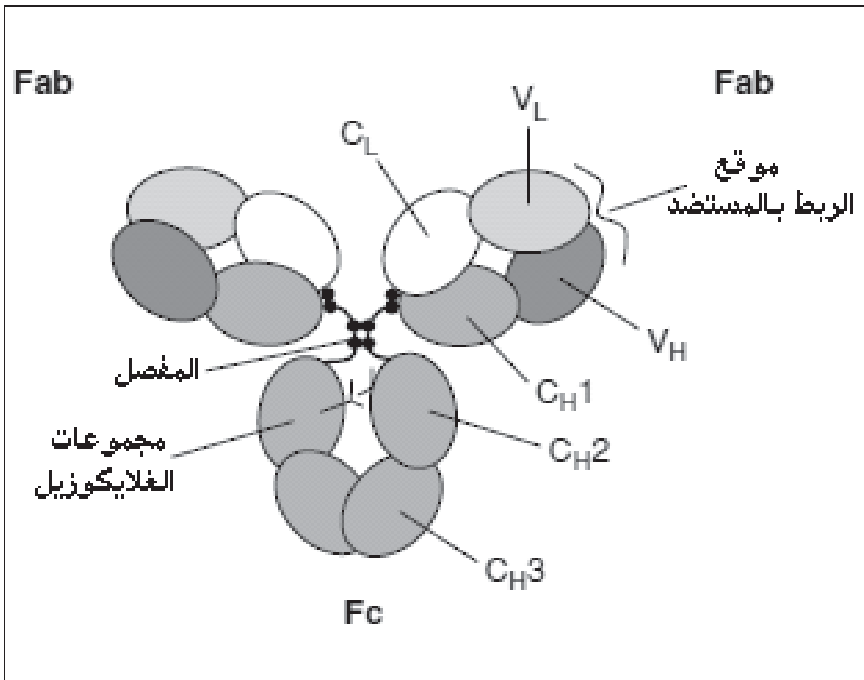
2.25 بنية ووظائف الجسم المضاد

Antibody structure and function

الأجسام المضادة هي بروتينات تشكل جزءاً من رد الفعل المناعي الظرفي ضد أجسامٍ مستمنعة وعوامل مُعدية. تعمل الأجسام المضادة كجزيئات وصيلة أساسية في الجهاز المناعي، ما يمكّن وظائف المستجيب الموروثة لدى المضيف من أن تتعرف على أشكالٍ غير متوقعة، متنوعة ومتغيرة من المستضد التي يمكن أن تواجَه خلال فترة حياة الحيوان. ووظائف المستجيب هذه هي آليات موروثة لتعطيل أو قتل الممرضات المُعدية، ومن ثم تحطيمها وإزالتها من الجسم. إلا أنها لا تمتلك القدرة للتعرف بسهولة على عوامل العدوى بأشكالها العديدة المختلفة. هذا التعرف أو الاستهداف في أنظمة المستجيب يعتمد، بجزءٍ منه، على قدرة الجسم المضاد ليكون نقطة مشتركة بين المستضدات الموجودة على عامل العدوى وأنظمة المستجيب في الجسم. إن أنظمة المستجيب هي موروثة داخل جينات خط البذرة للشخص، لكن نوعية (تخصص) الجسم المضاد هي مستمدة من خلال عمليات إعادة ترتيب جسدية معقدة للجينات التي تُشفر للغلوبولينات المناعية الموجودة داخل الخلايا البائية (وهي مجتمع فرعي من خلايا الدم البيضاء أو الليمفاويات). ويعني هذا أنه حتى التوائم المتطابقة أو الفئران المتحدرة من نفس النوع في المختبر، سوف يكون لديها تسلسلات مختلفة من الغلوبولين المناعي المعبّر عنها في وقت واحد.

إن المخطط التوضيحي الأساسي الذي يمثل الجسم المضاد هو الشكل البنيوي المعروف Y للغلوبولين المناعي G، وهو يضم ذراعين متطابقين من شدف الربط بالمستضد Fab، ومنطقة واحدة من الشدفة المتبلورة Fc، ومنطقة المفصل الأكثر مرونة التي تجمع شدف الربط بالمستضد مع منطقة الشدفة المتبلورة (انظر الشكل 1.25). مرة أخرى، طرأت هذه المصطلحات من كيمياء البروتين الأصلية حيث إن جميع الجزيء تمت تجزئته بواسطة أنزيمات تحليل البروتين، وبعد ذلك تم تعيين الخصائص المختلفة لمختلف أجزاء الجسم المضاد المعزولة. هذه البنية (أو الوحدة الفرعية) الجزيئية الأساسية هي مكونة من سلسلتين ثقيلتين متطابقتين وسلسلتين خفيفتين متطابقتين أيضاً، وذلك بناءاً على حجمهم الجزيئي. تحتوي كل سلسلة من هذه السلاسل على قطاعات كروية متكررة ذات بنية محفوظة خاصة بنوع الغلوبولين. وباستخدام المصطلحات البنيوية للبروتين، تمتلك قطاعات الجسم المضاد جديلات متضادة التوازي منعقدة على نفسها لتشكل صفائح بيتا β–sheets والتي تلتف بعد ذلك لتصبح أشكالاً شبيهة بالأسطوانات (انظر الشكل 2.25). تمتلك السلاسل الخفيفة اثنين من القطاعات الكروية هذه، بينما تمتلك السلاسل الثقيلة أربعة أو أكثر منها (اعتماداً على صنفها، انظر أدناه). تكون السلاسل الخفيفة والثقيلة بعدة أشكال مختلفة، مما يقدم مفهوم الأصناف والأصناف الفرعية للغلوبولين المناعي، فعلى سبيل المثال هناك أنواع μ، وγ، وε وα من السلسلة الثقيلة عند الانسان (وعند معظم الثدييات الأخرى)، الذين يعطون على التتالي أصناف الأجسام المضادة IgM، وIgG، وIgE وIgA. كما بالإمكان أن يكون لدى كلٍّ من هذه الأصناف إما النوع κ أو λ من السلاسل الخفيفة. إن نسبة غلوبولينات المناعة في البلازما لكل نوع من السلاسل الخفيفة يتغير تبعاً لنوع الكائن، ففي الإنسان تبلغ نسبة κ:λ 60: 40 تقريباً، بينما هي في الفئران حوالى 90: 10. هناك عند الإنسان أربعة أصناف ثانوية للغلوبولين المناعي G (IgG) تسمى IgG1، IgG2، IgG3 وIgG4 باستخدام سلاسل γ1، γ2، γ3 وγ4 على التتالي؛ بينما الغلوبولين المناعي A (IgA) لديه صنفان ثانويان فقط IgA1 وIgA2 باستخدام سلاسل α1 و α2. تُفرز بعض هذه

الأصناف من الغلوبولينات المناعية في البلازما على شكل بنيات متحدة أكثر تعقيداً، مكوّنة من وحدات فرعية متحدة مع جزيء يدعى سلسلة-J، مثل الغلوبولين المناعي M (IgM) الخماسي الأجزاء الذي يتألف من خمس وحدات فرعية بروتينية متطابقة، والغلوبولين المناعي A (IgA) الموجود عادةً على شكل ثنائي أو ثلاثي الأجزاء، والمؤلف من وحدات فرعية متطابقة متحدةً أيضاً مع سلسلة-J (انظر الشكل 3.25).

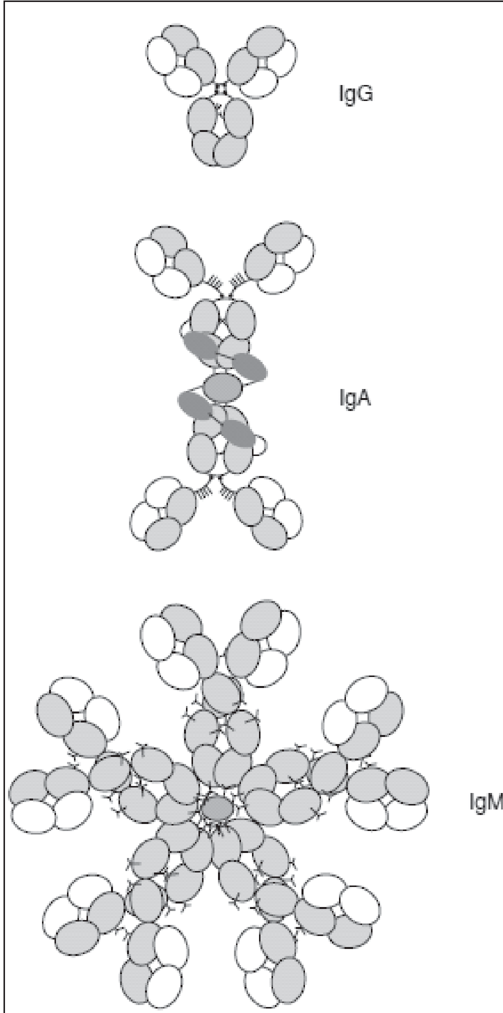


الشكل 2.25: رسم توضيحي بديل لبُنية غلوبولين المناعة G (IgG). كل قطاع كروي من الجزيء موضح كإهليج. قطاعات السلسلة الثقيلة مبينة في ظل أغمق وقطاعات السلسلة الخفيفة مبينة في ظل أفتح. القطاعات المتغيرة من السلسلة الثقيلة والخفيفة V_H وV_L مشار إليهم أيضاً بمحاذاة موقع الربط بالمستضد على أطراف كل Fab. كل قطاع من C_H2 هو مضاف إليه مجموعة غلايكوزيل وتقع الكربوهيدرات في الفراغ بين السلسلتين الثقيلتين. الجسور ثنائية الكبريت القائمة بين السلاسل مشار إليها كنقاط سوداء داخل منطقة المفصل المرنة.

إنها السلسلة الثقيلة المسؤولة بشكلٍ كبير عن "وظائف المستجيب" (تحطيم المستضد وإزالته) المُثارة بالتفاعلات المتبادلة مع خلايا الجهاز المناعي من خلال

ربطها (ارتباط وتشابك) بالمستقبلات على سطح الخلية (تدعى مستقبلات Fc لتطلّبها الشدفة Fc من الجسم المضاد) أو، بدلاً عن ذلك، من خلال تفعيل تسلسل المتممات ربطه بمستقبلاته. *والمتممات* هي عائلة أخرى من البروتينات الموجودة في الدم التي تنخرط في الاستجابة المناعية. إن مكونات مجموعة المتممات هي بشكلٍ أساسي أنزيمات تُحلِّل البروتين بصورة نوعية، حيث إن مركباتها الأولية تضم مكونات متممة أخرى تم تفعيلها بالتَحلُّل البروتيني. وبذلك يمنح هذا تضخيم كيميائي حيوي على نحوٍ تقليدي لخطوة التفعيل الصغيرة الأولية. إذ عند تفعيل مكونات المتممات هذه، فإنها تشكِّل بسرعة روابط كيميائية تشاركية مع المستضد، وهكذا توسمهم لكي يتم التخلص منهم بواسطة مستقبلات المتممات في جهاز المناعة. وفي المقابل، هناك متممات أخرى قادرة على إنشاء ثقوب في الأغشية الخلوية أو الفيروسية في الكائنات المصابة ما يؤدي إلى قتل الخلايا أو الفيروسات.

تُبدي كلٌّ من أصناف غلوبولينات المناعة (الأجسام المضادة) المختلفة ، وأيضاً الأصناف الفرعية، أنماطاً مختلفة من وظائف المستجيب، بحيث يكون بعضاً منها ملائماً أكثر للتعامل مع أنواعٍ معينة من المستضدات أو عوامل العدوى. إن لكل صنف من أصناف غلوبولينات المناعة المختلفة الصنف الخاص به من وظائف المستجيب المتعلقة بالشدفة المتبلورة. إذ توجد مستقبلات الشدفة المتبلورة الموصّفة جيداً لصنف IgG (FcγRI، وFcγRII وFcγRIII)، وصنف IgA (FcαRI) وصنف IgE (FcεRI وFcεRII) الموزعة بنسبٍ متفاوتة في الخلايا، والتي تبدو ألفات مختلفة تجاه الشدفة المتبلورة والصنف الفرعي، كما تساعد في عمليات تأشير مختلفة مما يحفز وظائف المستجيب المختلفة. بالإضافة إلى ذلك، لبعض هذه الأصناف من غلوبولينات المناعة مستقبلات انتقال تُمكّن، مثلاً، IgA من أن يُفرَز إلى المِعى، والجهاز البولي، والجهاز التنفسي، وفي الدموع واللعاب، وأيضاً في الحليب واللِّبى.



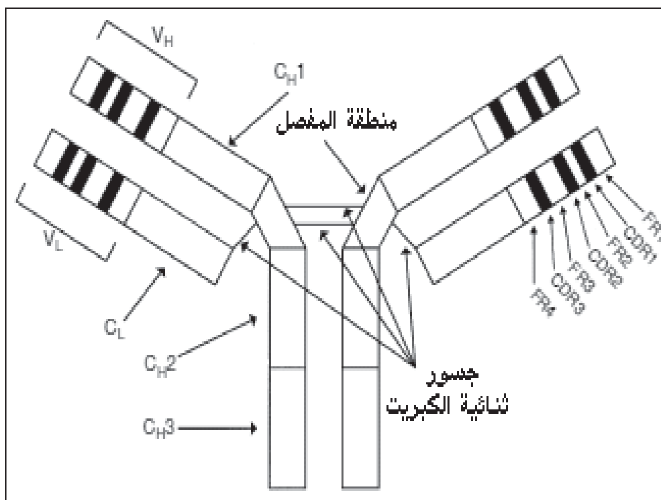
الشكل 3.25: أصول غلوبولينات المناعة. أصناف مختلفة من غلوبولين المناعة هي مبنية من نفس البنى الأساسية. في الأعلى يظهر غلوبولين المناعة G (IgG)، الذي يمكن أن يقارن بالشكل 2.25. في غلوبولين المناعة A (IgA) الإفرازي، وحدتان فرعيتان من IgA، كل منها هو شبيه بـ IgG، موصولتان ببعضهما البعض تشاركياً بجسور ثنائية الكبريت وعبر وحدة فرعية معروفة بسلسلة-J (رمادي غامق). خلال نقل وإفراز الـ IgA عبر بطانة المعى، تتحد به أيضاً مجموعة ثانية من الوحدات الفرعية المشتقة من مستقبل النقل. تُعرف هذه الوحدات الفرعية الإضافية الموجودة فقط على الـ IgA المُفرز بـ "المكونات الإفرازية" (أسود). يمتلك IgM بنية خماسية الأجزاء مؤلفة من خمس وحدات فرعية مربوطة ببعضها البعض تشاركياً بواسطة روابط ثنائية الكبريت ومتحدة مثل IgA، بوحدة فرعية واحدة من سلسلة-J (رمادي غامق).

إن المستقبل الذي ينقل IgA هو مستقبل عديد الغلوبولينات المناعية، فخلال نقل الـIgA، يتشطر المستقبل بحيث يبقى منه جزء يسمى المركب الإفرازي (لأنه تم توصيفه أساساً على أنه IgA المُفرَز وليس الموجود في البلازما) مصحوباً بالـIgA المفرَز (انظر الشكل 3.25). عند الإنسان، ينتقل الـIgG بشكلٍ ناشط عبر المشيمة خلال المراحل الأخيرة من الحمل لتأمين حماية مناعية أوّلية للمولود؛ أما في حيوانات أخرى كالقوارض مثلاً ، ينتقل الـIgG من اللِّبى عبر المِعى خلال الساعات القليلة الأولى من الولادة. يُدعى المستقبل الذي ينقل الـIgG بمستقبل الشدفة المتبلورة الوليدي (neonatal Fc receptor FcRn)، وهو

مسؤول أيضاً عن حماية الــIgG من عمليات الهدم، وبالتالي عن إطالة نصف عمره في البلازما من أيام إلى أسابيع. يحقق هذا المستقبل تلك الميزات للــIgG من خلال ربطه، عند قيمة منخفضة من الرقم الهيدروجيني pH، بمنطقة الشدفة المتبلورة من IgG داخل حويصلات إندوزومية داخل خلوية تحتوي على البروتينات المخصصة للتحطيم، حيث تجري عملية إعادة تدوير لهذا الغلوبولين المربوط ليُعاد إلى البلازما قبل تحطيمه، ثم عند إطلاقه يتم توجيهه إلى غشاء البلازما. في الحقيقة، إن هذه الإجراءات تملك أهمية وتبعات جديرة بالاعتبار فيما يتعلق بالتطبيقات الدوائية للــIgG داخل الجسم. إذ يعني نصف العمر الطويل للجسم المضاد في البلازما أن هناك حاجة لكمية أقل من هذا الجسم المضاد وبوتيرة أخف من أجل إبقاء التركيز المطلوب منه في البلازما. ففترة نصف العمر تعتمد على الربط النوعي للمستقبل FcRn بمنطقة الشدفة المتبلورة Fc للــIgG، وبذلك لا تأثير لخسارة شدفة الربط بالمستضد (Fab) في نصف العمر. من الواضح بسبب كون المستقبل FcRn هو نوعي للــIgG ، أن خصائص الانتقال المشيمي وامتداد فترة نصف العمر هي خصائص فريدة لهذا النوع من الغلوبولينات المناعية. إن الاسم FcRn تم وضعه أساساً للشكل الموجود في مِعى الجرذان الوليدة من مستقبل الــIgG فقط، ولكن سلسلة مقالات أكثر قدماً أصدرها الأستاذ الجامعي برامبل Brambell في أواسط الستينيات من القرن الماضي، تشير إلى التنبؤ بوجود شكلين من مستقبلات الــIgG ، لذلك يشير البعض الآن إلى شكلي (أو وظيفتي المستقبل: نقل الــIgG عبر المِعى في القوارض وعبر المشيمة عند الانسان) المستقبل هذا تحت الاسم الموحد FcRB.

وكما قد ذُكر، إن النوعية التي لدى الجسم المضاد تجاه المستضد هي خاصية الشدفة Fab من الجزيء. فالنوعية هي نتيجة التغير في أجزاء من تسلسلات شدفة Fab. يدعى قطاع النهاية الأمينية لكل من السلسلة الثقيلة والخفيفة بالمنطقة المتغيرة (قطاعات V_H وV_L). وقد سمح تحليل تسلسل الأحماض الأمينية في أعداد كبيرة من المناطق المتغيرة لكل من V_H وV_L بتعريف ثلاث مناطق

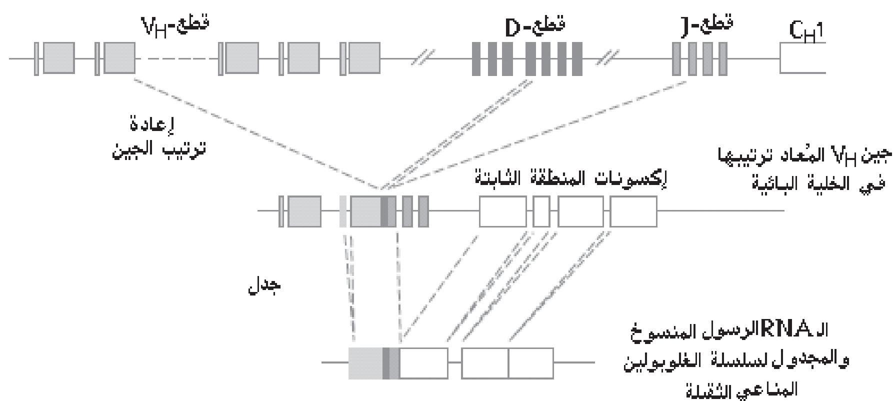
صغيرة ذات تغير مفرط داخل أربع مناطق هيكل إضافية محفوظة (FR1، FR2، FR3 وFR4). في البنيات الثلاثية الأبعاد، تشكل المناطق المفرطة التغير حلقات تجتمع مع بعضها البعض لتكوّن أسطح الربط بالمستضد الأساسية، وهكذا، فقد تم تسمية تسلسلات هذا الموقع بمناطق تحديد التوافق Complementary determining regions أو CDRs (CDR1، CDR2 وCDR3؛ انظر الشكل 4.25).



الشكل 4.25: مناطق من قطاعات الـ IgG المتغيرة. صُنفت تسلسلات هذه القطاعات إما كتسلسلات منطقة الهيكل (FR1، FR2 وFR3) أو كمناطق تحديد التكامل (CDR1، CDR2 وCDR3). إن تسلسلات منطقة الهيكل هي تسلسلات تذهب لتؤلف جدلات β المطوية، التي تشكل الشكل الأسطواني لبنية القطاع. تشكل مناطق تحديد التكامل بنيات الحلقات المتغيرة التي تؤلف مواقع الربط بالمستضد. هناك ثلاث حلقات CDR من كل سلسلة ثقيلة وثلاث أخرى من كل سلسلة خفيفة. تقوم هذه الحلقات الست مجتمعة بتشكيل موقع الربط بالمستضد في الجسم المضاد.

وبالاصطلاح الوراثي للتعبير عن الغلوبولين المناعي، فإن التسلسلات الفريدة لكلٍّ من الأجسام المضادة المختلفة هي نتيجة عملية إعادة الترتيب الجسدية لقطع الجين المختلفة في الخلايا البائية خلال تطورها (انظر الشكل 5.25). ففي حالة السلسلة الثقيلة، تجري إعادة ترتيب القطعتين V وJ. تؤدي عمليات إعادة الترتيب هذه إلى التعبير عن مستقبل الغلوبولين المناعي السطحي، يتبعها انتقاء نسيلات منفردة للخلايا البائية وذلك على أساس ربطها بالمستضد. من الممكن أن

تفضي عمليات تمايز إضافية في الخلايا البائية إلى تطفيرات جسدية في سلاسل منطقة- V و/أو إلى عمليات إعادة ترتيب جسدية من أجل جلب قطع المناطق الثابتة لمختلف الأصناف الثانوية ذات السلسلة الثقيلة إلى جانب قطع الجين التي تشفر إلى القطاع المتغير.



الشكل 5.25: إعادة الترتيب الجيني لجينوم خط البذرة. خلال تمايز الخلية البائية، تجري إعادة ترتيب تسلسلات قطعة غلوبولين المناعة الموجودة في الجينوم لإعطاء في كل نسيلة من الخلايا البائية، جين واحدة تشفر لسلسلة ثقيلة فاعلة من غلوبولين المناعة وجين واحدة تشفر لسلسلة خفيفة فاعلة من غلوبولين المناعة. هذه الجينات المعاد ترتيبها تبقى تتضمن الإنترونات (introns) التي يجب إزالتها من خلال عملية جدل الــRNA المنسوخ. إعادة ترتيبات قطعة V–D–J لجينات سلسلة غلوبولين المناعة الثقيلة هي مبينة. تمتلك سلاسل غلوبولين المناعة الخفيفة قطع –V و –J لكنها لا تمتلك قطع –D.

3.25 شدف الجسم المضاد البروتينية

Antibody protein fragments

يمكن إنتاج شتى الشدف البروتينية الموجودة في الأجسام المضادة بشكلٍ منفرد ومنفصل عن المكونات البروتينية الأخرى التي يمكن أن تُستخدم عملياً في ظروف مختلفة (انظر الشكل 6.25). يجري اشتقاق هذه الشدف بصورة ملائمة عن طريق التحليل البروتيني الأنزيمي. بشكلٍ عام، إن منطقة Fab هي مقاومة نسبياً لعملية التحلل البروتيني؛ بينما منطقة Fc، وبصورة خاصة ، منطقة المفصل

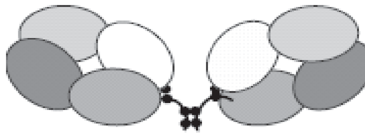
فإنها سريعة التأثر. واعتماداً على أنزيم البروتياز المستخدم والجسم المضاد المتماثل المحدد الذي يجري اختباره (والنوع الحيواني المُستَخرَج منه الجسم المضاد)، يمكن أن يكون هناك تشطر بواسطة التحلل البروتيني لمنطقة المفصل. وبذلك إذا حصل هذا، وكان موقع التشطر من جهة النهاية الكربونية للجسور ثنائية الكبريت الواقعة بين السلاسل، فعندئذٍ تتولد شدف $F(ab')_2$؛ أما إذا كان التشطر من جهة النهاية الأمينية، فتتولد شدف Fab. وكبديل، يمكن استخدام شروط اختزال معتدلة لفصل شدفة $F(ab')_2$ إلى شدفتين من F(ab').

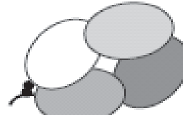
بالإمكان أيضاً التعبير عن شدف البروتين باستخدام تقنيات الــDNA المأشوب. تحتوي منتجات مأشوبة أخرى، كشدف Fv، فقط على قطاعات منطقة−V، غير المتحدة تشاركياً، والتي يمكن اعتبارها أصغر وحدة في الجسم المضاد الذي يجب أن يبقى قادراً على الربط بالمستضد، وذلك بالألفة الأصلية للربط على صعيد موقعٍ واحد. من أجل استقرار هذا الاتحاد لمناطق−V من السلاسل الثقيلة والخفيفة المأشوبة، باستطاعتنا إدخال قطعة جين تشفر لموصل اصطناعي بين النهاية الكربونية لأحد القطاعات والنهاية الأمينية للقطاع الآخر إلى خلية مناسبة للتعبير عن هذا البروتين المندمج كسلسلة واحدة من شدف Single-chain Fv (ScFv) Fv.

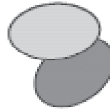
يمكن استخدام جميع شدف الأجسام المضادة الصغيرة في كلٍّ من الزجاج وداخل الجسم الحي، وذلك لاستمرار قدرتهم على الربط بالمستضد، لكنهم من ناحية أخرى يكونون قد فقدوا قدرة الربط بمستقبلات Fc وتفعيل تسلسل المتممات. إن حجم هذه الشدف الأصغر باستطاعته في بعض الحالات أن يحسن خصائص انتشارها وتغلغلها؛ خاصةً، عندما يجري استخدامهم لتبقيع شرائح الأنسجة في الزجاج، أو لاستهداف مستضدات خلوية داخل الجسم الحي. إلا أنه بالنسبة إلى غلوبولين المناعة G (IgG)، يؤدي فقدان الشدفة المتبلورة منه كما الشدف الأصغر حجماً، بالتأكيد، إلى انخفاض مهم لفترة نصف العمر في البلازما، كما هو مبين أعلاه.

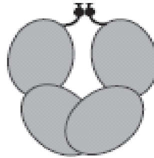
يجب التنبيه أيضاً إلى أن تعديلات ما بعد الترجمة التي تطرأ علي الجسم المضاد يمكن أن تكون حرجة بالنسبة إلى وظيفة الجسم المضاد. تُظهر الأصناف الرئيسية والفرعية من الأجسام المضادة أماكن محفوظة (مُصانة) لكل من السكريات

التي ترتبط بالآزوت والسكريات التي ترتبط بالأكسجين. ففي الـــIgG، تُعتبر منطقة C_H2 المحفوظة التي يتم فيها ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت ضرورية للعديد من جزيئات وظائف المستجيب (أي الربط ببعض مستقبلات الشدفة المتبلورة، وأيضاً تفعيل المتممات الذي يعتمد على عمليات الارتباط بالغلايكوزيل الصحيحة). وعلى نحوٍ مشابه، فإن الجسور ثنائية الكبريت التي تنشأ داخل السلاسل وفيما بينها، هي مهمة لبنية ووظيفة الجسم المضاد العامة، إذ إن الأسلوب الذي يتم فيه إنتاج الأجسام المضادة والطرق الخاصة لتنقيتها هي مواضيع هامة حتى تؤخذ بعين الاعتبار. فعلى سبيل المثال، يجب الأخذ بالحسبان عدم مقدرة البكتيريا على القيام بعمليات إضافة الغلايكوزيل أو تجميع وحدات البروتين، وإنشاء جسور ثنائية الكبريت خلال إنتاج غلوبولينات المناعة عن طريق التأشيب.









الشكل 6.25: الشدف الفرعية الفاعلة من جزيء IgG. يمكن توليدها إما من خلال التحليل البروتيني المحدود أو من خلال التعبير عن خلايا مأشوبة.

4.25 أُلفة الجسم المضاد Antibody affinity

إن مفهوم اُلفة، وبمعنى أصح شرَه، الجسم المضاد للمستضد هو مهم. في العديد من الاستخدامات، في الزجاج أو داخل الجسم الحي، تُعتبر الألفة عاملاً هاماً ليس فقط من أجل تحديد منفعته، ولكن أيضاً لنجاح المنتج تجارياً. تحديداً، إن الأُلفة (ثابت الاتحاد أو Ka يعبَّر عنه بوحدة القياس m^{-1}) هي قياس تركيز مركب الجسم المضاد المربوط بالمستضد بالنسبة إلى تراكيز الجسم المضاد والمستضد الطلقاء عند توازن الديناميكية الحرارية. وهي تفترض أن التفاعل المتبادل مع المستضد هو وحيد التكافؤ، الذي هو الحالة الأكثر ترجيحاً فقط عند وجود مستضدات بسيطة جداً أو شدف Fab أو Fv من الجسم المضاد. في الماضي، كانت تحدَّد ألفة الجسم المضاد بواسطة الانفكاك المتزن أو من خلال قياس الجسم المضاد الموسوم بمشع الذي هو مربوط بالمستضدات في ظروفٍ قريبة من التوازن. أما اليوم، فمن الشائع جداً تحديد النسبة المئوية مباشرةً لاتحاد وانفصال الجسم المضاد باستخدام تقنيات مثل الرنين البلازمي. ولكن، حري أن نتذكر إمكانية تقدير التقريب الجيد لألفة الجسم المضاد تجاه المستضد عن طريق قياس تركيز الجسم المضاد المحتاج إليه لإعطاء نصف حد الربط الأقصى بالمستضد. يعطي هذا ثابت الانفصال، Kd، المعبّر عنه بوحدة القياس m، التي هي في الحقيقة، مقلوب ثابت الاتحاد Ka (أي $Kd=1/Ka$).

يجب التذكر هنا أن الأجسام المضادة لديها، عادةً، إثنان أو أكثر من مواقع الربط بالمستضد المتطابقة. غالباً ما يكون التفاعل المتبادل للجسم المضاد الثنائي التكافؤ (مثل، IgG الكامل مع منطقتي Fab) أو المتعدد التكافؤ (مثل، IgM مع عشر مناطق Fab) مع مستضد متعدد التكافؤ (مثل، مستضد على سطح الخلية أو مستضد مقيد الحركة على سطحٍ صلب) هو معيار حاسم لتحديد قوة التفاعل المتبادل بين الجسم المضاد والمستضد. إن ألفة أو شرَه الجسم المضاد (Ab) للمستضد(Ag) يعود إلى النسبة بين معدل التفاعل الأمامي (forward) من أجل تشكيل المركب ومعدل التفاعل العكسي (backward) لتفكك المركب:

$$[\mathrm{Ab}] + [\mathrm{Ag}] \underset{k_{\mathrm{backward}}}{\overset{k_{\mathrm{forward}}}{\rightleftharpoons}} [\mathrm{AbAg}]$$

$$K_{\mathrm{a}} = \frac{1}{K_{\mathrm{d}}} = \frac{[\mathrm{AbAg}]}{[\mathrm{Ab}] \cdot [\mathrm{Ag}]} \qquad (1.25)$$

يمكن أن تكون الألفة تجاه المستضد لاثنين من المضادات الحيوية متشابهة عند التوازن، إلا أن واحداً منهم يمكن أن يكون لديه معدل تشغيل on-rate (ثابت اتحاد $K_{forward}$) أبطأ بكثير، وبالطبع، معدل فصل off-rate (ثابت انفصال $K_{backward}$) أبطأ وبشكلٍ متناسب مع معدل التشغيل. في معظم الأحوال، لا يتم استخدام الجسم المضاد تحت شروط توازن الديناميكية الحرارية: على سبيل المثال، عند استخدام ألفة الجسم المضاد لتنقية مستضد، أو عندما تُستخدم الأجسام المضادة في معايرات قياس مناعية. في مثل تلك الحالات، تكون عادةً كمية الجسم المضاد زائدة حيث يمكن أن يكون معدل التفاعل الأمامي ($K_{forward}$) الأسرع أمراً مرغوباً. وفي مثالٍ مختلف، كاستخدام الأجسام المضادة الموسومة بمشع لتصوير الورم إشعاعياً داخل الجسم، فإن الجسم المضاد بحاجة إلى أن يدور خلال الجسم وبعدها ينتشر ويتغلغل في الأنسجة حتى قبل أن يكون لديه فرصة الالتقاط بالمستضد. إن استقرار الجسم المضاد على الورم لدى ربطه (الألفة ومعدل الانفصال)، وأيضاً معدلات انتشار الجسم المضاد في الأنسجة (منتج الجسم المضاد أو حجم الشدفة) هي عوامل تحدد أي الأجسام المضاد أكثر ملاءمة.

5.25 خصوصية الجسم المضاد Antibody specificity

إن نوعية أو تخصص الجسم المضاد هو مفهوم هام آخر، غالباً ما يكون ملتبساً مع مفهوم الأُلفة. من حيث ما هو محسوس عملياً، تتعلق نوعية الجسم المضاد تجاه مستضده بالألفة أو الشَرَه بشكل جزئي فقط. فمن المحتمل جداً أن يكون للجسم المضاد طيف من الأُلْفات تجاه نطاق من المستضدات المختلفة. في بعض الأحيان يمكن أن تكون هذه المستضدات غير متعلقة ببعضها البعض تماماً، بينما في الأغلب فإنها تشترك في سمات بنيوية ذات علاقة (مثل العديد من بنيات مركبات الكربوهيدرات المختلفة التي تشترك في سمات عدة). إذ يمكن أن تُظهِر مختلف

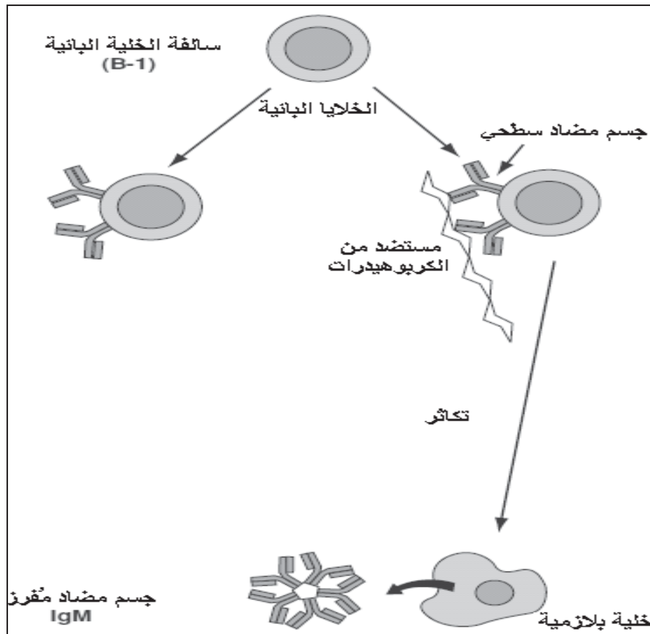
الأجسام المضادة لمستضد معين، تفاعلات وظيفية متقاطعة ومختلفة تجاه مستضدات أخرى. من الواضح ، إذا كان الاستخدام المرجو للجسم المضاد هو للتمييز بين مستضدات مختلفة في مزيج معقد، فعندئذٍ تكون التفاعلات المتقاطعة للجسم المضاد حاسمة كالشرَه تجاه المستضد الصحيح. أما عند استخدامه في حالات يكون فيها الالتقاء بالمستضدات "البديلة" غير محتمل، كما في عمليات التنقية التي تعتمد على الألفة من أجل فصل مستضدٍ منتَج في مزرعة الدفعة، فإنه لا يُعتد بأي من هذه التفاعلات المتقاطعة. من جهةٍ أخرى، خلال استخدام الأجسام المضادة في العلاج أو التشخيص داخل الجسم الحي، فإن هناك العديد من المستضدات المختلفة في الأنسجة التي يمكن أن تؤدي إلى نشوء تفاعلات متقاطعة غير متوقعة من قِبل الجسم المضاد على أنسجة غير تلك المقصود استهدافها، مما قد يكون عادةً عاملاً معقداً لتطوير المنتج القائم على أساس الجسم المضاد. تعود بالطبع مشاهدة التفاعل المتقاطع للجسم المضاد مع المستضد الثاني إلى شَرَه الجسم المضاد لذلك المستضد، بالإضافة إلى حساسية المعايرة المستخدمة لقياس التفاعل المتبادل. في الحقيقة، إن هذا التفاعل بإمكانه أن يؤدي إلى تدهور نوعية (تخصص) المعايرة وذلك بسبب ما يَتبيَّن من تحسن ظاهري في حساسيتها.

6.25 التمنيع وإنتاج أمصال مضادة متعددة النسيلة

Immunisation and production of plyclonal antisera

إن الطريقة الأقدم، والتي لا تزال تستخدم، لاستثمار جهاز المناعة هي القيام بتمنيع الحيوان بشكلٍ مستمنع من المواد أو الممرضات ذات الأهمية (ربما مراراً ولعدة شهور)، ثم بعد عدة أسابيع من آخر تمنيع يتم جمع بلازما أو مصل الدم لاستخدامها ككل أو على أقسام. من المهم فهم بعض تعقيدات الاستجابة المناعية من أجل إدراك بعض المشاكل المرافقة لاشتقاق مختلف أنواع المستضدات من الأمصال المضادة. يبيّن الشكلان 7.25 و8.25 رسوم موضحة ومبسطة جداً لنوعين مختلفين من استجابة الخلية البائية للمستضد وهما، الاستجابات المستقلة عن الخلية التائية (الشكل 7.25) والاستجابات المعتمدة على الخلية التائية (الشكل 8.25). تعود بشكلٍ كبير استجابة الخلية البائية، المستقلة عن الخلية التائية، إلى إثارة غلوبولين المناعة على سطح الخلايا البائية من خلال التشابك مع المستضد ذي البنية المتكررة جداً. تضم مثل هذه المستضدات الكربوهيدرات، والدهون السكرية والأحماض النووية. تُقاد

الخلايا البائية إلى التكاثر لتتمايز بعدها إلى خلايا بلازمية تفرز كميات كبيرة من غلوبولينات المناعة (صنف IgM بشكلٍ رئيسي). يضم هذا النوع من استجابات المناعة استجابات مضادات فئة الدم A ومضادات فئة الدم B لدى الانسان، الذين نشأوا جراء التعرض إلى كربوهيدرات بكتيرية، بحيث يتفاعل كلٌّ منهم تقاطعياً مع مستضدات فئة الدم لأشخاصٍ آخرين. وهذا مثالٌ ممتاز على التفاعلات المتقاطعة الطبيعية عند الأجسام المضادة لأن الأكثرية من الأشخاص الذين يحملون هذه الأجسام المضادة من غير المحتمل أن يكونوا قد واجهوا خلايا دم من فئة أخرى، باستثناء الأشخاص الذين تلقوا نقل دم غير موائم أو النساء عقب الحمل. إن مضادات الأجسام من مضادات مجموعات الدم A وB، الذين هم قبل كل شيء من الصنف IgM، لديهم أُلفة منخفضة ولكن لأنهم عديدو التكافؤ (خماسيو التكافؤ ما يعني أن الجزيء من غلوبولين المناعة هذا يمتلك عشرة أماكن ربط) وبوجود بنيات (أشكال) متكررة في المستضد، من الممكن أن يرتبط بالمستضد بشَرَه إلى حدٍّ كبير.



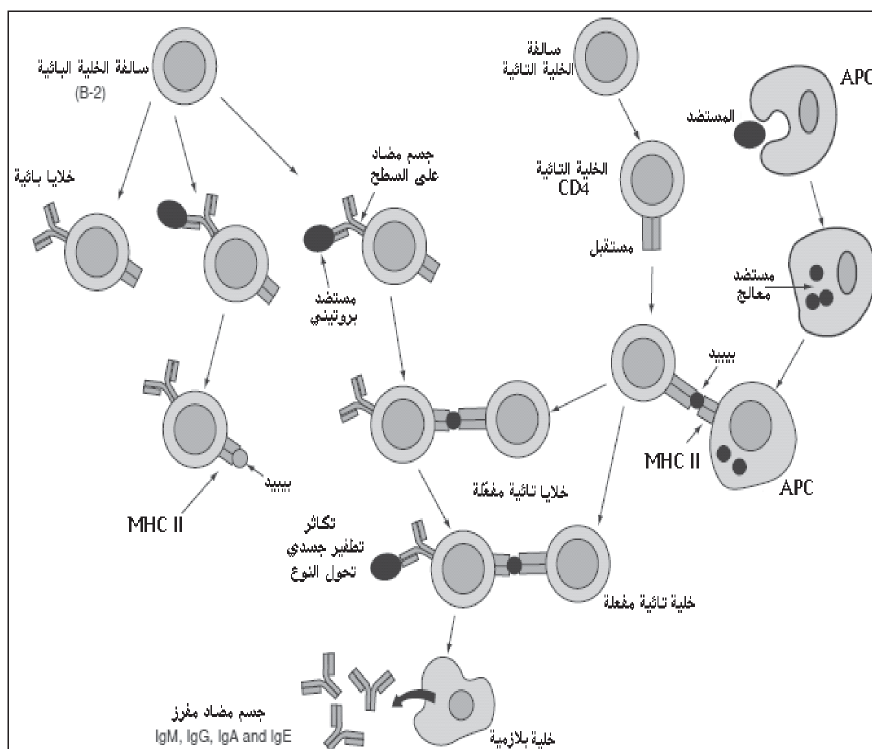
الشكل 7.25: إستجابة الخلية البائية المستقلة عن الخلية التائية. بعض الخطوات الأساسية لإنتاج IgM المُفرز من قِبل ما يسمى استجابة الخلية البائية المستقلة عن الخلية التائية. إن السمة الدقيقة التي لدى المستضد هي أنه عادة ما يكون ذا بنية متكررة من الأجزاء المتعددة (مثل الكربوهيدرات البكتيرية) وهو قادر على أن يتشابك مع الجسم المضاد الموجود على سطح الخلايا البائية التي تمتلك نوعية تجاه المستضد. بهذا الحدث تتفعّل هذه الخلايا البائية لتتمايز بعد ذلك إلى خلايا بلازمية تفرز الــIgM

وعلى العكس، يبدو أن استجابات المناعة إلى المستضدات التي تعتمد على الخلايا التائية هي أكثر تعقيداً وتضم عدة خطوات تتم بواسطة أنواع خلوية مختلفة من أجل الالتقاط بالمستضد بطريقة محددة وإتاحة تنظيم المركب (انظر الشكل 5.25). أولاً، يتم أخذ البروتينات بواسطة خلايا متخصصة عارضة للمستضد (APCs) ويجري تحطيمها إلى بيبتيدات. ثانياً، يكون بعض هذه البيبتيدات قادراً على الربط بجزيء الصنف II من مركب التوافق النسيجي الرئيسي (MHC II)، فتقوم هذه الخلايا بعرض البيبتيدات على سطحها كمركبات مع الـــ MHC II. بعد ذلك، لأن خلايا $CD4^+$ (الخلايا الموجبة لـــ "لقب التجمع Cluster designation") التائية تقتصر على الصنف II للربط بالمركب المكون من الـــMHC والبيبتيد، فإنها تتفعّل بواسطة الخلايا العارضة للمستضد.

تجدر الإشارة هنا إلى أن الخلايا البائية هي أيضاً قادرة على أخذ المستضد وذلك عن طريق مستقبل خاص لديها، وهو غلوبولين مناعي سطحي مربوط بالغشاء، وبالنتيجة تقوم أيضاً بعرض البيبتيدات في حيز الـــMHC II. وإذا التقطت خلية $CD4^+$ مفعَّلة تائية بخلية بائية عارضة للمستضد، فإنه بإمكانها أن تساعد الخلية البائية من خلال إطلاق إشارة تفعل الخلية البائية كي تنقسم، وتتمايز وتفرز الجسم المضاد لديها. وخلال عدة دورات من التعاون الخاص بين الخلية البائية والخلية التائية، فإنه باستطاعة الخلية البائية أن تتحول لتنتج أجساماً مضادة أخرى كـــIgG، وIgA وIgE، كما يمكن أن تخضع إلى تطفير جسدي وتكون منتقاة للربط بالمستضد بألفة أعلى. لذلك وبصورة عامة، يجب أن تكون مستضدات الخلية البائية المعتمدة على الخلية التائية بروتينات أو متحدة ببروتين.

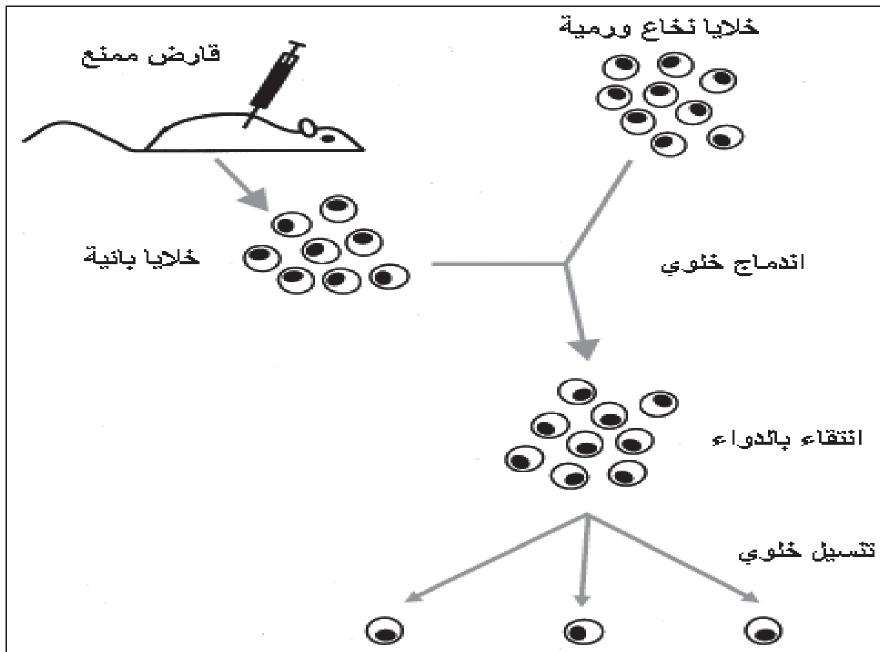
هناك سمة هامة ومشتركة بين الخلايا البائية المستقلة عن الخلية التائية والمعتمدة عليها، وهي مفهوم التحمل الذاتي. بشكلٍ عام، يوجد في جهاز المناعة مراكز توقيف وضبط تقوم بتقليل فرص تعرّف الغلوبولين المناعي على المستضد الذاتي المصنّع بكميات. ومثل الخلايا البائية المتفاعلة ذاتياً فإنه يتم التخلص منها.

في الحالات الشديدة التطرف، يمكن حدوث اختراق للتحمل الذاتي مما قد ينتهي إلى حالة مرضية من استجابة المناعة الذاتية.



الشكل 8.25: استجابة الخلية البائية المعتمدة على الخلية التائية. يتضمن إنتاج الجسم المضاد الناتج من استجابة الخلية البائية بالاعتماد على الخلية التائية، التعرف على المستضد والتعاون فيما بين عدد من أنواع الخلايا المختلفة التي تضم الخلية التائية المساعدة (التي تعبّر عن جُزَيء الــCD4، ومستقبل مساعد للــMHC II) وما يسمى بالخلايا العارضة للمستضد أو APCs (خلايا البلعمة الكبيرة والخلايا المتشجرة). سميت الخلايا العارضة للمستضد بهذا الاسم لأنها تعرض على سطحها مركباً من جزيء الــMHC II يحتوي، في داخل أخدود الربط، على ببتيدات من المستضد. هذه الببتيدات هي مُشتقة من خلال التحليل البروتيني لجزيئات المستضد التي تم ابتلاعها. وقبل أن يكون بإمكان الخلايا البائية النوعية بالمستضد أن تتمايز إلى خلايا بلازمية تفرز الجسم المضاد، فإنها يجب أن تُساعَد من قِبل الخلايا التائية $CD4^+$ المساعِدة المفعَّلة. ومن أجل هذا التفعيل، يجب أولاً للخلايا التائية $CD4^+$ المساعِدة أن ترى المستضد "المعالج" معروضاً بواسطة خلايا البلعمة الكبيرة أو الخلايا المتشجرة (APC).

يعني التحمل الذاتي أنه من الأسهل توليد جسم مضاد يستجيب لمستضدات ليس لها أي علاقة بالمستضدات الذاتية في الحيوان الممنع. فعلى سبيل المثال، من المحتمل جداً أن يكون هناك فروقات عديدة بين البروتينات المشتقة من الإنسان ومستخدمة لتمنيع فأر (تمنيع تهجيني) من تلك المشتقة من فأرٍ ومستخدمة لتمنيع فأرٍ من نوعٍ آخر (تمنيع متباين). إن المناطق المختلفة من المستضد والتي تم التعرف عليها من قبل الجسم المضاد تسمى حواتمَ مستمنعة، وبالتالي من المحتمل أن يكون التمنيع التهجيني هو من اجل زيادة الأجسام المضادة لحواتم أكثر في المستضد مما هو في التمنيع المتباين. من الممكن أن يكون هذا هاماً، وستتم مناقشته لاحقاً، لأن تعرف عدة أجسام مضادة بنفس الوقت على حواتم مختلفة في مستضدٍ واحد يمكن أن ينتهي إلى تحسن ظاهر في الألفة (الشره) ونوعية التفاعل.



الشكل 9.25: إنتاج الأجسام المضادة وحيدة النسيلة. يتطلب هذا اندماج خلايا الطحال، من قوارض ممنعة، مع خلايا ورمية نخاعية مكيفة للنمو في المزرعة الخلوية. تُنتَقى خلايا الورم الهجينة الناتجة من خلال قدرتها على النمو في أوساط سامة للخلايا الورمية النخاعية الأبوية، وبعد ذلك يتم تنسيلها بحيث أن كل نسيلة تقوم بإنتاج جسم مضاد وحيد النسيلة واحد.

عامل هام آخر في التمنيع هو أن بعض المستضدات هي مستمنعة أكثر من بعضها الآخر. يمكن أن يعود هذا جزئياً إلى التحمل الذاتي، ولكن من المعتقد الآن أيضاً أن المكون الهام للاستجابة المناعية هو تفعيل جهاز المناعة بإشارات خطيرة. لذلك من الممكن دمج المستضد بمواد أخرى كالزيوت المعدنية ومكونات مشتقة من كائنات مجهرية التي باستطاعتها أن تعمل كمساعدات لتفعيل الجهاز المناعي وتحسين عملية معالجة المستضد وعرضه بواسطة الخلايا العارضة له APCs.

عَقِب إنتاجها، بإمكان الأمصال المضادة أن تُستخدم في العديد من الأنظمة كأدوات مخصصة للكشف عن المستضد. يمكن تنقية قسم الغلوبولينات المناعية من الأمصال المضادة، ثم القيام باستخدامها في أنظمة كشف ومعايرات عدة. على سبيل المثال، يمكن وسمها من خلال قرنها تشاركياً بأصباغ مفلورة، حيث يتم بعدها استخدام المجهر أو تقنية قياس الانسياب الخلوي لكشف المستضد المربوط أو الموجود في الخلايا. وعلى حدٍّ سواء، يمكن وسم الجسم المضاد بأنزيم واستخدامه في علم الأنسجة أو في معايرة المناعة الممتزة المتصلة بالأنزيم (ELISA؛ انظر الفقرة 2.10.25) مرة أخرى للكشف عن المستضد المحدد.

7.25 الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies

تقليدياً، تُشتق الخطوط الخلوية التي تفرز الأجسام المضادة وحيدة النسيلة عن طريق أخذ الخلايا البائية، التي تمتلك مقدرة تكاثر محدودة في الزجاج، والقيام بتخليدها من خلال الدمج الخلوي الجسدي مع خط خلوي مناسب مأخوذ من مزرعة الأنسجة (انظر الشكل 9.25). ولأسباب تتعلق غالباً بالتفاعلات المتبادلة المعقدة بين الجينات التنظيمية (مثل عامل النسخ) المشفَرة على صبغيات مختلفة في أنواعٍ من الكائنات المختلفة، فقد أثبتت هذه التقنية أنها الأنجح في مجالٍ محدود من أنواع الكائنات، بشكلٍ خاص في إنتاج الأجسام المضادة وحيدة النسيلة من أصناف الــ IgM والــIgG من الجرذان والفئران، بالرغم من استخدام أنواع كائنات أخرى كالأغنام والهامستر والإنسان.

يوجد عدد كبير من التغيرات في الطرق المستخدمة من أجل الاندماج الخلوي والانتقاءاللاحق للخلايا الورمية. وهي موثقة جيداً في الكتب والمقالات النقدية العاكفة على علم المنهجية. بالرغم من أن كوهلر (Kohler) وميلستين (Milsten) قاما باستخدام الفيروس *Sandia* لتحفيز الاندماج الخلوي في تجاربهم المبكرة، إلا أنه تم استبدال هذا الفيروس عالمياً تقريباً بالغلايكول متعدد الإثيلين (PEG) أو بتقنيات الاندماج الكهربائية. ففعالية الإجراءات المستخدمة لإنتاج خلايا ورمية هجينة من الجرذان والفئران هي عالية الفعالية وبالإمكان نموذجياً الحصول على عدة مئات إلى الآلاف من نسيلات الخلايا الورمية الهجينة المنفردة وذلك من طحال حيوان واحد.



الشكل 10.25: الأجسام المضادة الخيميرية. من خلال استخدام تقنية الـ DNA المأشوب، يمكن هندسة أجسام مضادة ذات خصائص جديدة. تتألف هذه لتقنية من خطوة بسيطة يجري فيها دمج المناطق المتغيرة من جسم مضاد مأخوذ من حيوان قارض (أبيض) مع المناطق الثابتة للجسم المضاد البشري (أسود)، وخطوة إضافية تضم دمج تسلسل الـ DNA المشفر لمنطقة تحديد التكامل (CDR) في الجسم المضاد المأخوذ من القارض مع تسلسل الـDNA المشفر لمنطقة الهيكل (FR) في الجسم المضاد البشري، لإعطاء جسم مضاد مؤنسن بشكل كامل.

وقد تم إثبات وجود صعوبة كبيرة في إنتاج أجسام مضادة بشرية وحيدة النسيلة من خلال استخدام الاندماج الخلوي الجسدي أو التحويل الخلوي. إذ إن الوقت والجهد المبذول لإنتاجها هو أكبر بكثير من ذلك المطلوب لإنتاج ما يعادلها من أجسام مضادة فأرية أو جرذية وحيدة النسيلة. هذه الصعوبة في إنتاج الأجسام المضادة البشرية وحيدة النسيلة هي التي قادت إلى إيجاد استراتيجيات استنقاذ للأجسام

المضادة البشرية بواسطة تقنية العرض بالعاثية أو، كبديل، من أجل "أنسنة" أو "إعاة تشكيل" أجسام القوارض المضادة باستخدام تقنية الــ DNA المأشوب وهي ما تسمى بــ "هندسة الجسم المضاد".

8.25 هندسة الجسم المضاد Antibody engineering

من الممكن الآن الهندسة الوراثية لنطاق بنيات الجسم المضاد المبتكرة والمتفاوتة والتعبير عنها ككل، وبالتالي تحرير علماء التقانة الحيوية من القيود المفروضة بواسطة البيولوجيا الطبيعية لجهاز المناعة. فالذي جعل التلاعب بجينات الغلوبولينات المناعة اقتراحاً مباشراً وواضحاً نسبياً (انظر الشكل 5.25) هو البنية النموذجية لجزيئات الجسم المضاد، المؤلفة من مجموعة من القطاعات الكروية المنفصلة والمشفَرة بجينات ذات بنية نموذجية مماثلة والتي بها يُشفَر عن كل قطاع بإكسون منفصل. هناك عدة ميزات واضحة للأجسام المضادة المأشوبة تجعلها أفضل من تلك المشتقة تقليدياً.

من خلال استخدام استراتيجيات التنسيل الملائمة، فإن عزل الجينات التي تُشْفِر لأي جسمٍ مضاد مصنع من أي نوع من الكائنات الممنعة هو قابلٌ للتطبيق تقنياً؛ وهكذا لا حاجة إلى أن تكون التطبيقات في المستقبل مقتصرة على عمليات اشتقاق أصناف الأجسام المضادة من الفئران والجرذان والإنسان.

غالباً ما يكون بالإمكان اشتقاق أجسام مضادة وحيدة النسيلة ذات النوعية الصحيحة، إلا أنها من الممكن أن تبدي تفعيلاً لوظائف المستجيب الخاطئة لأنها ليست من نوع الكائنات، أو الصنف الرئيسي أو الصنف الفرعي المنشود من غلوبولينات المناعة. وعلى نحوٍ بيِّن، يمكن لأي من المناطق المتغيرة (المناطق-V) أن يُعبَّر عنها بشكلٍ مندمج مع أي من المناطق الثابتة المنتقاة لخصائصها المرغوبة، وذلك باستخدام تقانة الــDNA المأشوب. وتسمى الأجسام المضادة هذه بالأجسام المضادة الخيميرية (انظر الشكل 10.25). هكذا، يمكن دمج المناطق

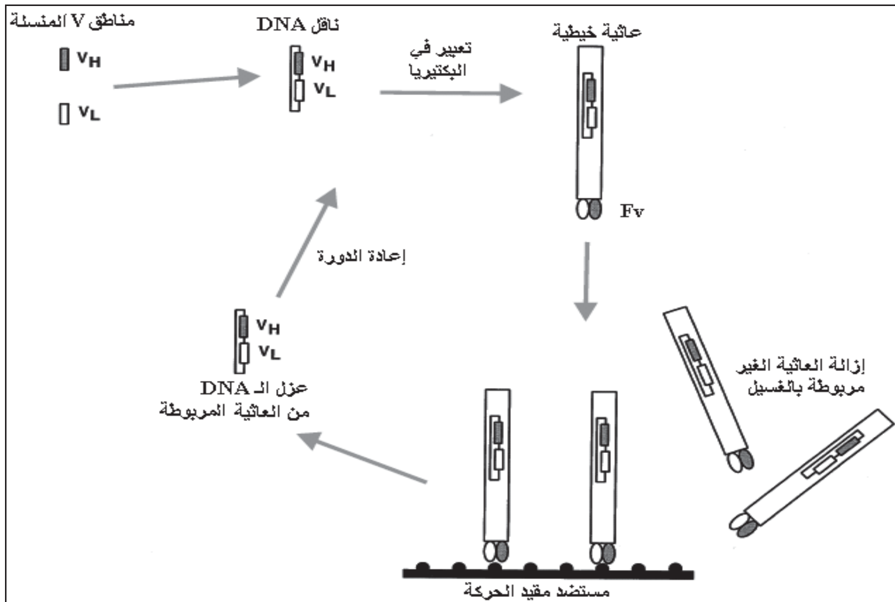
المتغيرة من الأجسام المضادة النوعية لمستضد تم اختياره لدى القوارض بالمناطق الثابتة التي تشفر لغلوبولين المناعة (ذو صنف رئيسي وفرعي) لدى الإنسان، وبذلك يكون المنتج النهائي لديه استخدامات مهمة داخل الجسم الحي لعلاج الإنسان. كما أنه من الممكن أيضاً إدخال طفرات إضافية إلى مناطق Fc من أجل تعديل خصائصها وتصبح مناسبة لتطبيقات الجسم المضاد المقترحة، على سبيل المثال، من أجل إزالة قدرة الربط ببعض مستقبلات Fc أو تفعيل المتممات.

وحيث إن التطبيقات العلاجية داخل الجسم الحي هي التي تعنينا، إلا أنه غالباً ما تكون الأجسام المضادة المأخوذة من القوارض محدودة بسبب إثارتها الاستجابة المناعية في المريض ضد الجسم المضاد، وذلك عادةً خلال أسبوع من بدء استخدامها، مما يمنع أي معالجة إضافية بعد هذا الوقت. وكما وُصِف أعلاه، يمكن القيام بـــ"أنسنة" الأجسام المضادة وحيدة النسيلة عند القوارض بشكلٍ جزئي من خلال تشكيل أجسام مضادة خيميرية بحيث يتم دمج المناطق المتغيرة لدى القوارض مع المناطق الثابتة لدى الإنسان، وبالتالي إدخال آليات المستجيب عند الإنسان وتقليص عدد الحواتم المستمنعة في نفس الوقت. يتطلب العلاج المناعي عدة صفات أساسية للجسم المضاد حتى يتم استخدامه بنجاح. فهو يجب أن يمتلك النوعية المرغوبة للربط بالمستضد ذي العلاقة، كالمستضد المُعبَّر عنه على سطح الخلية الورمية، أو المستضد الفيروسي أو ربما السمّ البكتيري. وعند ارتباطه بذلك المستضد، فإنه يتطلب من الجسم المضاد إحداث عمل ما. في الحقيقة، يمكن استخدام هذ الجسم المضاد في التصوير الإشعاعي عند وسمه بمشع أو استخدامه لتحطيم الخلية الورمية أو الفيروس. وكبديلٍ عن ذلك، يمكن استخدامه لتعطيل الفيروس أو السم. يتيح إنتاج الجسم المضاد الخيميري وانتقاء الصنف الرئيسي والفرعي الأكثر ملاءمة من غلبولين المناعة لدى الانسان الاستبقاء على أو إضافة وظائف مرغوبة، كما أنه بنفس الوقت، يقلل من "غرابة" الجسم المضاد بالنسبة إلى المريض (انظر الشكل 10.25).

وكخطوة إضافية للتخفيف من استمناع أو "غرابة" الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المشتقة من القوارض، بالإمكان أيضاً "أنسنتها" أو "إعادة تشكيلها" بشكلٍ

كامل من أجل إنتاج أجسام مضادة بشرية تحتوي فقط على الثمالات الأساسية من المناطق المتغيرة، عند القوارض، المسؤولة من الربط بالمستضد، مدمجة مع مناطق الهيكل من المناطق المتغيرة لدى الانسان (انظر الشكل 10.25).

بعد التلاعب بجينات الجسم المضاد، من الممكن القيام بالتعبير عنها في عدد من أنظمة التعبير المختلفة. يمكن أن ينتج من تنبيغ جينات الجسم المضاد، المنسّلة في نواقل ملائمة داخل خلايا ورمية نخاعية، التعبير عن جزيئات هذا الجسم التي تمّت معالجتها، وإضافة مجموعة الغلايكوزيل عليها بطريقة هي من سمات غلوبولين المناعة المنتج بواسطة الخلايا الورمية والخلايا البائية. من الممكن أيضاً التعبير عن الأجسام المضادة في أنواع خلايا ثديية أخرى كخلايا مبيض الهامستر الصني (CHO). وقد جرى أيضاً التعبير عنها في عدد من الخلايا الأخرى حقيقية النواة وفي أنظمة خلوية ذات نواة أولية، مثل الخلايا النباتية، والخميرة والبكتيريا. ولكن، تُواجَه في بعض أنظمة التعبير هذه مشاكل معينة تتعلق رئيسياً بإضافة مجموعة الغلايكوزيل وتشكيل رباط ثنائي الكبريت، ما يمنع التعبير عن جزيئات كاملة، أو يجعل عملية تنقية الجسم المضاد المنتج أكثر تعقيداً. تمتلك الأجسام المضادة الطبيعية قطاعات متعددة في كل سلسلة وسلاسل متعددة في كل جزيء، حيث إن لدى هذه السلاسل روابط ثنائية الكبريت بين قطاعاتها وأيضاً فيما بينها. لذلك يجب أن تكون الخلايا المستخدمة للتعبير عن الجسم المضاد قادرة على تجميع الجزيء بالشكل الصحيح. إضافة إلى ذلك، تتطلب معظم وظائف المستجيب للجسم المضاد من صنف IgG، ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت على نحوٍ صحيح. وبالتالي، إن البكتيريا هي في الحقيقة مناسبة فقط للتعبير عن شدف أصغر من الأجسام المضادة كشدف Fc وFab. حالياً، معظم الإنتاج التجاري على المستوى الضخم للجزيئات من الجسم المضاد، خصوصاً في التطبيقات العلاجية، تنفذ باستخدام خطوط خلوية ليمفاوية بائية أو خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO).



الشكل 11.25: إحداث مكتبة العرض بالعاثية. يمكن التعبير عن شدف الجسم المضاد على سطح الفيروس العاثي من خلال الـــ DNA المعبأ داخل العاثية الذي يشفر إلى المناطق المتغيرة من الجسم المضاد. وبالتالي، من خلال انتقاء العاثية على أساس ارتباطها بالمستضد، من الممكن عزل الـــDNA الذي يشفر بدوره إلى مناطق–V من الجسم المضاد التي ترتبط بالمستضد. يمكن تكرار الدورة من أجل تحسين الإخصاب وانتقاء العاثية التي ترتبط بأعلى أُلفة.

9.25 المكتبات الاندماجية وتقنية العرض بالعاثية

Combinatorial and phage display libraries

تفيد التطورات الأخيرة في علم الأحياء الجزيئي أنه بالإمكان تنسيل والتعبير عن الجينات الثديية بسرعة في البكتيريا، عادةً، عن طريق استخدام أنظمة ناقل العاثية (انظر الفصل). في تقنية العرض بالعاثية، تُنَسَّل الجينات المُشفِرة للمناطق المتغيرة من غلوبولينات المناعة إلى نواقل العاثية (انظر الشكل 11.25). بعد ذلك، تُستخدم نواقل الفيروس العاثي المعدلة هذه لتحويل البكتيريا ، حيث يتم، خلال مرحلة تجميع جسيم العاثية، التعبير عن مناطق غلوبولين المناعة المتغيرة على سطح جسيمات العاثية. وبالتالي، إذا أُصيبت كل خلية بكتيرية بنوع واحد من العاثية فقط، فستكون جميع الفيروسات المصنعة الجديدة تحمل الـــDNA الذي

يشفر إلى نفس شدف Fv وFab من الجسم المضاد المعروضة على سطح العاثية. لكي يعمل هذا النظام، من البديهي أنه يجب فصلل العاثية التي تشفر لشدف Fc وFab الخاصة بالمستضد المطلوب عن الآخرين، ليتكاثر بعدها أكثر وأكثر. ويتحقق هذا بشكلٍ دقيق من خلال انتقاء العاثية اعتماداً على ألفتها للمستضد (انظر الشكل 11.25)، بحيث خلال عدة جولات من عملية الانتقاء، تُنتَقى الفيروسات ذات الألفة الأعلى ليجري تكاثرها. في النهاية، من الممكن إعادة عزل الجينات من جسيمات العاثية والتعبير عنها في أنظمة أخرى. مثلاً، أنظمة التعبير التي تُنتج شدف Fc أو Fab بصورة منحلة من ناقل العاثية.

إن استجابات الجسم المضاد في الجسم ككل هي عابرة، إذ إن الجسم المضاد الذي يظهر في الاستجابة إلى التمنيع أو الإصابة، يختفي بعدها مع الوقت بمجرد إزالة المستضد من الجسم. أما تقنية العرض بالعاثية، فتقدم القدرة على استرجاع استجابة (ردة فعل) الجسم المضاد المأخوذ من أي حيوان ممنع تقريباً، على شكل جينات مُنسَّلة تشفر للمناطق المتغيرة من السلسلة الثقيلة والخفيفة بشكلٍ منفرد. إن معظم استراتيجيات تنسيل جينات الجسم المضاد في العاثية تستخدم تنسيلاً عشوائياً لـــ"مكتبات" تسلسلات السلسلة الثقيلة والخفيفة، ثم التعبير عنها بقرنٍ عشوائي بين مكتبة واحدة لسلسلة غلوبولين المناعة الثقيلة، ومكتبة احدة لسلسلة غلوبولين المناعة الخفيفة في كل عاثية على انفراد. تنشأ هذه المكتبات الاندماجية من خلال تنسيل ذخيرة السلاسل الثقيلة والحفيفة لغلوبولين المناعة من الـــRNA الرسول المعزول من أنسجة مانح مناعة تحتوي على خلايا بائية، وذلك عادةً باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR. غير أنه يجب تذكُّر أن مثل المكتبات الناتجة من عمليات الدمج المستنقَذة بعد الغربلة هي ليست بالضرورة ممثِّلة لعمليات الدمج الموجودة في الخلايا البائية الطبيعية. هذه النقطة الأخيرة يمكن أن تكون ذات أهمية، فكما ذُكر أعلاه، فإن الذخيرة الخلوية البائية الموجودة في الحي تم انتقاؤها عبر نظام معقد من إعادة الترتيب الجيني العشوائي، وبعد ذلك تلاها انتقاء إيجابي وسلبي. إن سبب هذا الانتقاء، الذي يتضمن تعرفاً نوعياً

بالمستضد من قبل الخلية التائية وكذالك مساعدتها، هو لتقييد استجابة الجهاز المناعي ضد المستضدات "الغريبة" ومنع التفاعلات المتقاطعة مع المستضدات الذاتية. بالتالي، يمكن توليد وانتقاء مثل هذه الاندماجات للسلاسل الثقيلة والخفيفة في المكتبات الاندماجية التي يتم الانتقاء عليها في الاستجابة المناعية الطبيعية. كما أنه بالإمكان أيضاً استخدام تقنية العرض بالعاثية لتقليد الاستجابة المناعية من خلال توليد مكتبة اصطناعية عشوائية من الجينات المصنعة ذات تسلسلات تحديد تكامل عشوائية (انظر الفقرة 2.25؛ ما يعني أنها غير مشتقة عن طريق تنسيل الجينات من الخلايا البائية). لقد جرى استخدام مثل هذه الجينات بنجاح لغربلة (البحث عن) عدد من نوعيات الجسم المضاد المختلفة.

إن العائق الأساسي في مكتبات العرض بالعاثية هو أن وظيفة الجسم المضاد الوحيدة التي جرى اختبارها هي الربط بالمستضد، التي قد لا تكون الوظيفة المحتَّمة في الاستعمال النهائي. وبالرغم من أنه بمجرد عزل الجينات من الممكن أن يعبّر عنها بانسجام مع المناطق الثابتة لأي غلوبولين مناعي، إلا أنه لا يمكن استخدام معايرات تعتمد على وظيفة المستجيب لكشف تلك الأجسام المضادة المنتجة من قبل العاثية التي تمتلك النوعية المناسبة. إضافة إلى ذلك، من السهل نسبياً غربلة مكتبات العاثية على أساس الربط بمستحضرات مستضد متجانسة منقّاة، لكنه في المقابل، من الصعب جداً غربلتها على أساس الربط النوعي بمزيج معقد، كالمستضدات السطح الخلوية، حيث يمكن أن يكون المستضد المطلوب هو مكوِّن ضئيل في المزيج.

10.25 استخدامات الأجسام المضادة المأشوبة والأجسام المضاد وحيدة النسيلة في الزجاج

In vitro uses of recombinant and monoclonal antibodies

1.10.25 التنقية بالألفة Affinity purification

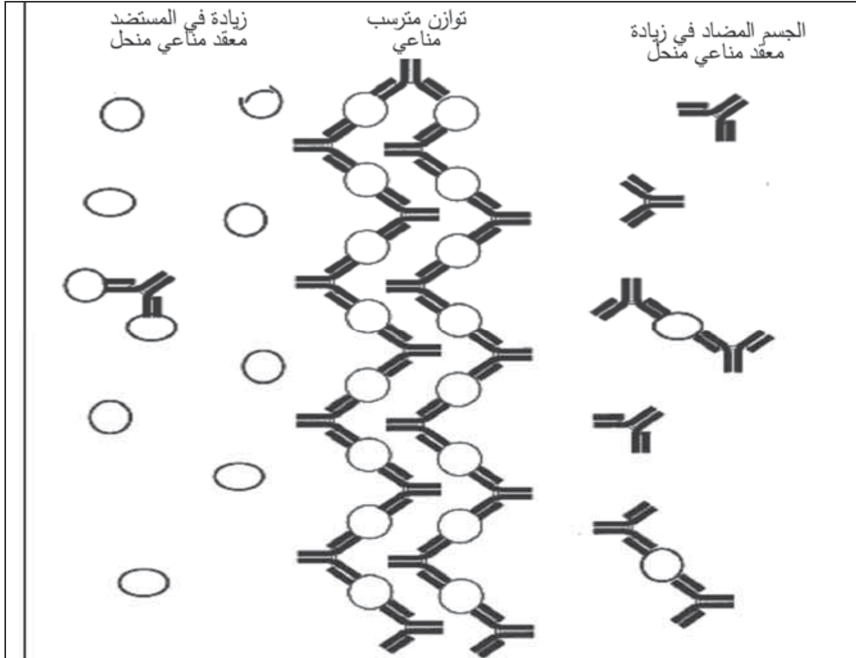
تضم الاستخدامات الأساسية للأجسام المضادة أدواراً في تنقية جزيئات أخرى من خلال تنفيذ إجراءات ربط تعتمد على الألفة، التي غالباً ما تكون بخطوة

واحدة. ويعتمد هذا على قدرة اشتقاق أجسام مضادة، وبصورة خاصة، أجسام مضادة وحيدة النسيلة أو مأشوبة، لديها نوعية فريدة ومميِّزة للمستضد المختار. من أجل إنشاء أمصال مضادة ناجعة في عملية تنقية المستضد التي تعتمد على الألفة، فإنه عادةً ما يكون من الضروري وجود مستضد منقّى جيداً للبدء به. وسبب ذلك هو أن مضادات الأمصال سوف تكون محتوية على مختلف الأجسام المضادة، أي أنها ستكون متعددة النسيلة، وبذلك يجب تنقية الأجسام المضادة بالألفة بطريقة ما. لكن، خلال عملية اشتقاق الأجسام المضادة، من الممكن العمل بمزائج ملوثة من المستضدات مع استمرار الحصول بعدها على كاشف ناجعاً لعملية تنقية المستضد بالألفة. وذلك لأنه عند تمنيع الحيوان بمستضد ملوث فسيتم تصنيع أجسام مضادة ضد جميع المستضدات المختلفة المجودة فيه، وبذلك ستكون الأمصال المضادة من الحيوان محتوية على مزيج كامل من الأجسام المضادة. أما عندما تُنَسَّل الخلايا البائية الورمية الهجينة المنفردة في مزرعة، فإن جميع هذه الأجسام المضادة المختلفة النوعية (الانتقاية للمستضد) يتم فصلها، والنسائل التي تفرز الجسم المضاد النوعي للمستضد المختار من الممكن انتقاؤها وانتاج كميات كبيرة منها. على نحوٍ مشابه، تتيح الأجسام المضادة المأشوبة إنتاج أجسام مضادة واحدة ونقية ذات نوعية وألفة معرّفتين.

يمكن استثمار ألفة الجسم المضاد لمستضده وانتقائية الربط به في تقنيات مثل **الترسيب المناعي**. في هذه التقنية يتم مزج الجسم المضاد مع المستضد مما يؤدي إلى تشكيل معقدات مناعية. إن أساس هذه المعقدات هو أن الجسم المضاد، طبيعياً، لديه على الأقل موقعا ربط، وبذلك باستطاعته نظرياً أن يرتبط على الأقل باثنين من المستضدات المتطابقة. أما إذا كان المستضد، بدوره، لديه أكثر من موقع ربط مستمنع (أو حواتم)، عندئذٍ يكون بإمكان المستضد والجسم المضاد أن يشكّلا سلاسل أو درجات أعلى من التكتلات (معقدات مناعية). في بعض الأحيان، تتشكل معقدات مناعية كبيرة بحيث تصبح غير منحلة لتترسب بعد ذلك. يمكن فصل هذه الترسبات المناعية بعيداً عن المستضدات الأخرى في المحلول من خلال الطرد

المركزي وغسل الترسبات، والحصول في النهاية على مزيج نقي نسبياً من المستضد المختار والجسم المضاد له.

هناك العديد من المشاكل التي ترافق هذا النوع من تفاعلات الترسيب المناعي. أولاً، لأن هذه التفاعلات تعتمد بشكلٍ كبير على تكافؤ التفاعلات المتبادلة بين المستضد والجسم المضاد في المعقد المناعي، إذ إن هذه التقنية لا تعمل لدى استخدام أجسام مضادة وحيدة النسيلة بينما تميل للعمل بشكلٍ أفضل مع مزائج من هذه الأجسام أو مع أمصال مضادة متعددة النسيلة. وأيضاً، لأن أفضل عملٍ لتفاعلات الترسيب المناعي يقع في مجال تركيز ضيق حيث يجب أن يكون الجسم المضاد والمستضد في تعادل. وبذلك عندما يكون أحد أطراف هذا المجال من الجسم

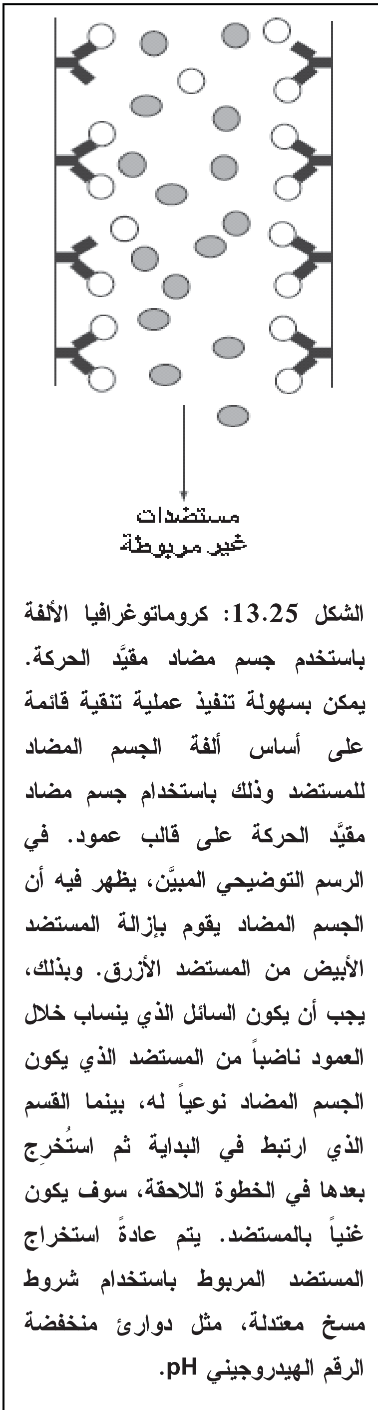


الشكل 12.25: تشكيل الترسبات المناعية. باستطاعة الأجسام المضادة والمستضد أن يجتمعوا ليشكلوا معقدات مناعية. وبذلك يترسب المستضد مناعياً بواسطة الجسم المضاد. لحصول هذا، يجب أن تكون تركيزات الأجسام المضاد والمستضد مناسبة، وإلّا يتم تشكل معقدات مناعية صغيرة منحلة.

المضاد أو المستضد في زيادة، من المحتمل أن تتشكل فقط معقدات مناعية صغيرة منحلة. لقد استُغل هذا المبدأ في تفاعلات تقنية الانتشار المناعي حيث يتاح للجسم

المضاد والمستضد بالانتشار تجاه بعضهم البعض في طبقة من الأغاروز شبه الصلب، حيث بالإمكان مشاهدة خطوط الترسبات المناعية بالعين، والتي تدل على نقاط التعادل بين المضاد والمستضد (انظر الشكل 12.25). ومن خلال المقاييس والضوابط يمكن تكييف هذه التقنية لتقدير تراكيز المستضد أو الجسم المضاد في المزائج وحتى أيضاً لتقييم نقاوتهم.

هناك استراتيجية بديلة، وهي قائمة على تقييد حركة الجسم المضاد على قالب دعم صلب، كحبيبات السيفــاروز Sepharose، باستخدام التفاعل الكيميائي التشاركي، حيث يتم رصّ هذه الحبيبات في عمود ثم يُمرر المحلول الذي يحتوي على المستضد من خلالها (انظر الشكل 13.25). عندئذٍ يقوم الجسم المضاد بإزالة المستضد من باقي المزيج بواسطة عملية كروماتوغرافيا الألفة. هذه العملية يمكن أن تستخدم مباشرةً على سبيل المثال لإزالة الشوائب كالسم من بروتين آخر، بوجود الجسم المضاد أو الأمصال المضادة النوعية للسم على العمود. أما إذا كان المستضد المربوط بالجسم المضاد على القالب مطلوباً، فمن الضروري إيجاد شروط تعطِّل ألفة الربط، وهناك العديد من الطرق الملائمة تحت شروطٍ مختلفة. فإذا كانت ألفة التفاعل المتبادل بين الجسم المضاد



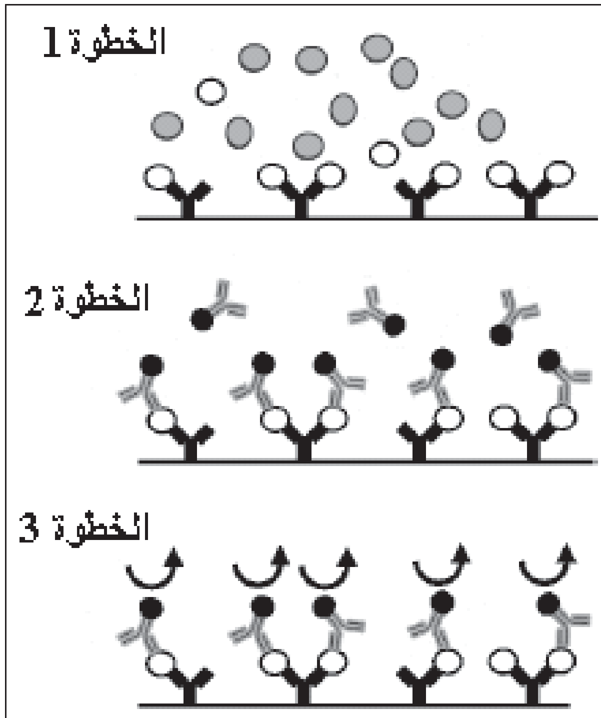
الشكل 13.25: كروماتوغرافيا الألفة باستخدم جسم مضاد مقيَّد الحركة. يمكن بسهولة تنفيذ عملية تنقية قائمة على أساس ألفة الجسم المضاد للمستضد وذلك باستخدام جسم مضاد مقيَّد الحركة على قالب عمود. في الرسم التوضيحي المبيَّن، يظهر فيه أن الجسم المضاد يقوم بإزالة المستضد الأبيض من المستضد الأزرق. وبذلك، يجب أن يكون السائل الذي ينساب خلال العمود ناضباً من المستضد الذي يكون الجسم المضاد نوعياً له، بينما القسم الذي ارتبط في البداية ثم استُخرِج بعدها في الخطوة اللاحقة، سوف يكون غنياً بالمستضد. يتم عادةً استخراج المستضد المربوط باستخدام شروط مسخ معتدلة، مثل دوارئ منخفضة الرقم الهيدروجيني pH.

والمستضد منخفضة، فإنه يمكن تحقيق الادمصاص عن طريق المنافسة برابطٍ بديل. بينما عند تفاعلات متبادلة ذات ألفة أعلى، فإنه من الضروري استخدام ظروف مسخ جزئية وعوامل Chaotropic أو قيم متطرفة للرقم الهيدروجيني pH. وغالباً ما يجب الأخذ بتسوية بين سهولة استرداد المستضد والثباتية الطويلة الأمد للجسم المضاد (إذا كان سيُعاد استخدامه) أو للمستضد (إذا كان من المطلوب إبقاؤه سليماً وفعّالاً).

تُستخدم تفاعلات الترسيب المناعي في أغلب الأحيان في حالات تجريبية حيث يكون مزيج المستضد موسوماً بمشع ليُشغل بعدها على هلام الهجرة الكهربائي. تسمح تقنية ترسيب المستضد مناعياً، أو عملية تنقيته على عمود بالاعتماد على ألفة الجسم المضاد، بفصل المكون الموسوم بمشع عن غيره من المكونات وتثبيت معرفته بواسطة تفاعله مع الجسم المضاد. وكما وُصف أعلاه، يمكن أن تُستخدم عملية التنقية بالألفة على عمود الجسم المضاد إما لإزالة الشوائب من المزيج، كالسم مثلاً، أو كبديل، من أجل تنقية مستضد ما خارج المزيج. تميل أعمدة الألفة هذه للعمل بشكلٍ أفضل عندما يكون الجسم المضاد لديها أكثر من المستضد، بينما يعوّل الترسيب المباشر على التعادل بين الجسم المضاد والمستضد. وإذا كان سيُعاد تدوير العمود واستخدامه من جديد، أو أنه من المطلوب استرجاع المستضد سليماً، عندئذٍ من المهم أن تكون الألفة ليست بكبيرة جداً. في حين، إذا كان من المهم مثلاً إزالة جميع بقايا المستضد من المزيج، كالسم، فإن الجسم المضاد على العمود يجب أن يكون أكثر من المستضد وذا ألفة ليست بالمنخفضة جداً.

من الممكن تكييف الطرائق المذكوة أعلاه لاستخدام طرائق غير مباشرة. ويكون هذا عن طريق اقتران جزيئات ذات ألفة تجاه الجسم المضاد، كبروتين A أو G، بقالب الألفة حيث يتم بعد ذلك تمرير المزيج الذي يحتوي على الجسم المضاد والمستضد عبر هذا القالب. بالتالي، سوف يؤدي ربط الجسم المضاد بالعمود إلى ادمصاص المستضد بشكلٍ غير مباشر. وبطريقة مماثلة، يمكن تعديل الأجسام المضادة كيميائياً بهبتينات (Haptens) كيميائية (وهي جزيئات صغيرة

يمكن أن تتعرف عليها الأجسام المضادة ولكن يجب أن تكون مقترنة تشاركياً بحوامل بروتينية لتصبح مستمعة ولتُستخدم في التمنيع) كالبيوتين (Biotin)، بحيث أن جزيئات ذات ألفة تجاه البيوتين كالأفيدين (Avidin) والستريبتافيدين (Streptavidin)، يمكن أن تُعلَّق بقالب العمود. كما يمكن أيضاً استخدام مضادات غلوبولين المناعة (مثل الأجسام المضادة عند الغنم النوعية للــIgG الفأري) لتقوم بادمصاص معقدات المناعة من خلال الألفة أو ترسيبها مناعياً.



الشكل 14.25: إجراء بسيط لتقنية ELISA ذات الموقعين. في الخطوة الأولى, يُستخدم الجسم المضاد المقيَّد الحركة على السطح من أجل التقاط المستضد من المحلول. تُزال بعدها المستضدات الزائدة وبذلك غير المربوطة بالغسيل. في الخطوة الثانية، يضاف الجسم المضاد الموسوم بالأنزيم والنوعي لموقع ثانٍ من المستضد. بعدها، ومرة أخرى، يُزال الجسم المضاد الموسوم الزائد الذي لم يرتبط بالمستضد، بالغسيل. أخيراً، يُضاف المركب الأولي ويتم تحديد تحوله بالأنزيم على مدى فترة معين من الوقت. عادةً تجري مراقبة التغير في اللون الناتج من تشكل المنتج باستخدام جهاز قياس الطيف.

2.10.25 الكواشف التشخيصية Diagnostics

إن الاستخدام الهام للأجسام المضادة، وبشكلٍ خاص الأجسام المضادة وحيدة النسيلة، هو في التطبيقات التشخيصية. فالنوعية التي لدى الأجسام المضادة تسمح لها بأن تُستخدم لتحديد المستضد مباشرة حتى في المزائج المعقدة. على سبيل المثال، يمكن استخدام هذه الأجسام لتحديد تراكيز هورمون محدد في عدة عينات من الدم. وباستخدام المقاييس والضوابط المناسبة، يمكن لطرائق الكشف أن تقيس كمية المستضدات المختارة في النظام، عادةً، من خلال وسم الجسم المضاد بواسم بحيث يتم تحديد كميته التي تعبِّر عن كمية المستضد. تشتمل الواسمات المستخدمة بصورة عامة على النظائر المشعة، والأنزيمات والفلوروكرومات، بحيث تستخدم أنظمة الكشف المناسة للكشف عنها.

إن **المعايرة المناعية الممتزة المتصلة بالأنزيم ELISA** هي واحدة من التقنيات الأكثر تداولاً في المجال التشخيصي المتوفرة اليوم. مبدأها الأساسي هو بسيط؛ يتم قرن الأنزيم مباشرة بالجسم المضاد، وذلك عادة باستخدام إجراءات التشابك الكيميائي، بعد ذلك يمكن تحديد كمية الجسم المضاد المربوط بالمستضد بشكلٍ غير مباشر من خلال قياس تحول المركب الأولي إلى منتج بواسطة الأنزيم. هذا التحول هو تكافئي؛ لكنه يضم تضخيماً للإشارة، لأن جزيئاً واحداً من الأنزيم باستطاعته أن يحول العديد من جزيئات المركب الأولي خلال وقت محدد. في حالة استخدام مركبات أولية ملوّنة أو تشكل منتجات ملونة، فإن قياس بسيط ادمصاصي بواسطة مقياس ضوئي سوف يحدد كمية التفاعل الأنزيمي. كما أنه من الممكن جعل هذا القياس يحدد معدل التفاعل مباشرةً وقت حصوله.

هناك العديد من التغيرات الدقيقة التي تجري على أساس نظام الـــELISA. في الشكل الأبسط لهذا النظام، يكون المستضد ممتزاً على سطح صلب، إما بصورة غير نوعية، أو عبر رابط ألفة أو رباط كيميائي تشاركي. بعدها تُضاف كمية زائدة من الجسم المضاد الموسوم بالأنزيم إلى النظام بحيث أن بعضاً منه يرتبط بالمستضد المقيد الحركة. تتم إزالة الكمية الزائدة من الجسم

المضاد بالغسيل وبعدها يضاف المركب الأولي. تُقدر كمية الأنزيم، ومن ثمة كمية مركب الجسم المضاد والمستضد في هذا الشكل من نظام الــELISA، من كمية المركب الأولي المتحول بالأنزيم. وفي الأشكال الأكثر من العادية، فقد تكون الــELISA متضمنةً موقعي تعرف مع استخدام اثنين من الأجسام المضادة المختلفة، أو أنها تعتمد على نظام كشف غير المباشر (انظر الشكل 14.25). على سبيل المثال، أحد الأجسام المضادة يمكن أن تُقيد حركته على قالب صلب، ويستخدم لالتقاط (يمتز بالألفة) المستضد. والثاني المقترن بالأنزيم، يحدد كمية المستضد المُلْتَقَط وذلك بالتعرف على موقع مختلف من المستضد فلا ينافس الجسم المضاد الآخر. أما في أنظمة الكشف غير المباشرة، فإنه توظف عدة طبقات من مضادات الأجسام المضادة أو من طبقات البيوتين والأفيدين (Avidin) ما يعطي تضخيماً أكبر للنظام. وبديلاً عن ذلك، يمكن أن تُصمم الأنظمة لتحديد كمية المستضد المجهولة في النظام عبر التنافس في الربط بكمية معروفة من المستضد نفسه الموسوم والنقي (وهي طريقة موظفة أساساً وبشكل كبير في المعايرات المناعية المشعة). وبالتالي، يشاهد أقصى ربط للمستضد الموسوم لدى غياب المستضد المنافس في عيّنة الاختبار، وأدنى ربط للمستضد الموسوم في حال وجود كمية زائدة ضخمة من المستضد المنافس في عيّنة الاختبار.

توظَّف الأجسام المضادة الموسومة بالأنزيم أيضاً في الكيمياء الخلوية المناعية. ففي هذا المجال، تُحَضَّر شرائح من النسيج أو اللطخات الخلوية على شرائح المجهر الزجاجية. بعدها تُحضن هذ الشرائح مع أجسام مضادة نوعية لمختلف مستضدات النسيج ومقترنة بالأنزيمات. ثم تُضاف المركبات الأولية للأنزيم وذلك بعد إزالة الكمية الزائدة من الجسم المضاد بالغسيل. يتم اختيار المركبات الأولية بحيث إنها تعطي منتجاً غير منحل، ملوناً، ويترسب على الشريحة للتمكن من مشاهدته بالمجهر الضوئي والمترافق مع استخدام عدّاد مناسب للجزيئات الملونة مما يتيح تصنيفاً مفصلاً جداً للخلايا الملونة. وهكذا، لدى استخدام المُلون المناسب ومن خلال التمركز المشترك للأجسام المضادة في الاختبار مع

الواسم المعروف، فإنه من الممكن تحديد أي أجزاء من الخلية، مثلاً السطح، أم السيتوبلازم أم النواة، تحتوي على المستضد الذي جرى التعرف عليه من قِبل الجسم المضاد. مرة أخرى، كما وُصف أعلاه في نظام الــELISA، بالإمكان تعديل التقنيات لاستخدام طبقات متعددة من الجسم المضاد ومضاد الجسم المضاد من أجل تضخيم التلوين. وكما في وسم الجسم المضاد بالأنزيم، من الممكن أيضاً وسم الجسم المضاد بالأصباغ المفلورة (الفلوروفور Fluorophores) مع استخدام مجهر فلوري للكشف عنه. تُستخدم الأجسام المضادة المترافقة مع الفلورة في تقنية الــ**Confocal microscopy** الضخمة، التي تتيح تحديد موقع الفلورة بدقة على، أو في، الخلية ومشاهدتها بطريقة تعتمد على الوقت. تؤخذ الصورة في هذه التقنية على مستوى بؤري دقيق حيث تتم رقمنتها ثم حفظها في الحاسوب. هذه الصور، التي تمثل "شرائح" خلال الخلية، يمكن أن تُطور بعدها إلى صورة ثلاثية الأبعاد تشكلها كثافة الفلورة على مدى الخلية ليجري عرض نموذج تصويري عالي الدقة. وإذا تم التقاط الصور على مدى فترات متفاوتة من الوقت، فإنه من الممكن أيضاً استخدام الحاسوب لتوليد فيلم مقتصر يبين حركة الفلورة داخل الخلية.

لقد تطورت تقنية **الفرز الخلوي باستخدام الجسم المضاد المفلور (Fluorescent antibody cell sorting)** وكذلك التحليل التقني مع تقنية الجسم المضاد وحيد النسيلة. هذه التقنية هي أيضاً ذات مبادئ بسيطة. يتم فيها وسم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة بالفلوروكروم لتُستخدم في تلوين الخلايا. بعد ذلك تمرر الخلايا بسرعة عالية عبر فوهة في مجرى قطرات سائلة وذلك على نحو مرور خلية واحدة في الوقت واحد في حزمة شعاع ليزر الذي يثير الفلوروفور. عندئذٍ تقوم الكواشف بقياس الفلورة الصادرة من كل خلية بشكلٍ فردي. وفي نفس الوقت، يمكن أن تقاس أيضاً خصائص أخرى للخلايا من خلال قدراتهم على تشتيت حزمة الضوء (حجم وحُبَيْبِيَة الخلايا). كما من الممكن استخدام فلوروفورات مختلفة ذات أطياف انبعاث مختلفة لوسم أجسام مضادة مختلفة. وبذلك يكون بالإمكان تنفيذ تحاليل متطورة جداً حتى في المزائج المعقدة؛ على سبيل المثال،

يمكن فصل خلايا دم الإنسان على حسب أنواعها الأساسية وأنواعها الفرعية. فقد اعتَمَد تصنيف تسمية جميع المستضدات على سطح خلايا الانسان (والآن حيوانات أخرى)، باستخدام "لقب التجمع (Cluster designation (CD"، بشكلٍ كبير جداً على استخدام التحليل الخلوي المفلور. إن نتائج التحليل التي نُفذت في العديد من المختبرات على لوحات من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة إنما هي تُستخدم من أجل تجميع هذه الأجسام المضادة في مجموعات ذات تفاعلية متشابهة، حيث تبدو هذه التجمعات أنها معقدة إحصائياً. وبذلك اعتمدت اللجنة العالمية لقب التجمع برقم تسلسلي جديد في سلسلة CD (مثلاً CD1، CD2، CD3، إلخ) لتصنيف الخلايا التي تُبدي هذه التجمعات. وبالرغم من أنه متداول بين الناس استخدام اسم CD للدلالة على المستضد، إلا أن الدلالة الأساسية لهذا الاسم تعود إلى مجموعات الأجسام المضادة. وبالتالي الأجسام المضادة التي تدعى بـــ"مضادات -CD1"، مثلاً، هي فارغة من حيث المعنى، لأن تجمع الأجسام المضادة هو الـــ CD1، والمستضد هو الذي يتم التعرف عليه من قِبل تجمع الأجسام المضادة CD1.

11.25 استخدامات الأجسام المضادة المأشوبة والأجسام المضادة وحيدة النسيلة داخل الجسم الحي

In vivo uses of recombinant and mono clonal antibodies

مرة أخرى، إن استخدامات الأجسام المضادة في الحي تعتمد بشكلٍ كبير على النوعية البارزة تجاه المستضد. من السهل في بعض الأحيان عند تناول استخدامات الأجسام المضادة وحيدة النسيلة في الجسم الحي نسيان أن الأجسام المضادة التي في أجسامنا تلعب دوراً رئيسياً في جهاز المناعة الطبيعي لدينا، وذلك في حمايتنا من الإصابات من خلال قتل الممرضات وإزالة المستضدات المؤذية. ولكن، على الرغم من هذا الدور الواضح للأجسام المضادة، هناك، في الحقيقة، القليل فقط من العلاجات المستخدمة حالياً التي تستغل خصائص الأجسام المضادة وحيدة النسيلة. ويعود هذا بشكلٍ كبير إلى اعتبارات تجارية، وعملية وأخلاقية متضمَّنة في تطوير العلاجات بالأجسام المضادة. إن الخوض بمشروع إدخال جسم مضاد واحد فقط في التجارب

السريرية والحصول على ترخيص رقابي للترويج لبيعه تجارياً واستخدامه هو أمر هائل الكلفة ويحتاج إلى وقت طويل. والحالة هي أكثر تعقيداً إذا تم تقبلها بوجود العلاجات المستخدمة الآن. لقد تم تصنيع وإعطاء الـــIgG البشري المتعدد النسيلة (مثلاً كمستحضر يدعى IVIG، أي غلوبولين المناعة G الذي يعطى حقناً بالوريد Intravenous IgG) لعلاج اضطرابات عديدة تكون فيها المناعة السلبية Passive immunity نافعة. وعلى حدٍّ سواء، جرى أيضاً تجريب واختبار الأمصال المضادة المتعددة النسيلة، المستخرجة من الأحصنة أو الغنم والتي تعمل ضد السموم البكتيرية (مثلاً سم الكزاز)، وسمّ الأفعى وتسمم الأدوية (مثلاً الديجاكسن Digaxin)، كعلاجات لحالات التسمم الحاد. إن هذه العلاجات بالأجسام المضادة هي فعالة ومن الممكن، نظرياً، استبدالها بأجسام مضادة وحيدة النسيلة، إلا أن هذا قد لا يكون قابلاً للتطبيق اقتصادياً وعملياً. لكنه يبقى واضحاً أن هناك دوراً مهماً للعلاجات بالأجسام المضادة وحيدة النسيلة، حتى مع ما تم إثباته الآن من فعالية الأمصال المضادة المتعددة النسيلة، فالإشكالات التجارية والرقابية هي التي تشكل العوائق الرئيسية. هناك مثال واحد من الممكن أن يتم فيه التغلب على هذه العوائق، وهو احتمال استبدال مضادات المستضد RhD (Rhesus D) البشرية المتعددة النسيلة، المستخدمة لمنع مرض تحلل خلايا الدم الحمراء لدى حديثي الولادة Haemolytic dsease of the newborn (HDN)، بجسم أو بمزيج من الأجسام المضادة البشرية وحيدة النسيلة النوعية لمستضد RhD . إن مستضد RhD هو غير مُعبّر عنه على خلايا الدم الحمراء في نسبة مهمة من المجتمع، وبالتالي فإن الأم التي تحمل فئة دم سلبية قادرة على انشاء استجابات مناعية ضد خلايا الدم الحمراء لدى جنينها إذا كان يحمل فئة دم RhD^+ نتيجة وراثته هذا النمط الظاهري من والده. إذ إن مضاد RhD عند الأم باستطاعته أن يخترق المشيمة (إذا كان من الصنف IgG) ويسبب تحطيماً لخلايا الدم الحمراء لدى جنينها. لا يحصل مرض تحلل خلايا الدم الحمراء لدى حديثي الولادة (HDN) عند ولادة أول مولود يحمل فئة دم RhD^+، لأن استجابة الأم المناعية تأخذ وقتاً لتُطور الجسم المضاد IgG ضد مستضد RhD. إلا أنه خلال الحمل اللاحق مع فئة دم إيجابية لمستضد RhD، فإن الأجسام المضادة IgG تتطور بسرعة أكثر (استجابة المناعة الثانوية). لقد وُجِد أن إعطاء الأم مضادات RhD عند

وقت الولادة بإمكانه أن يكبت استمناعها بمستضدات RhD . وهكذا، في هذا المثال عن المستضدRhD، يمكن أن يلعب القلق حول الاستخدام الآمن (في ضوء وجود الأمراض مثل المرض الدماغي الإسفنجي عند الأبقار BSE، والشكل الجديد من مرض جاكوب الكروتسفيلدت nvCJD) لمزيج منتجات الدم في علاج الأم السليمة في عمر الإنجاب، دوراً هاماً في دفع التحول نحو استخدام المنتج وحيد النسيلة.

وعلى العكس، لقد تم تطوير العديد من الأجسام المضادة لاستخدامها داخل الجسم الحي وذلك في حالات يمكن ألا تلعب الأجسام المضادة الطبيعية فيها أي دور هام، كمحاولات استئصال الخلايا الورمية من الجسد. ويعود السبب بشكلٍ رئيسي إلى عدم توفر علاجات بديلة، ما يجعل تجربة العلاجات القائمة على أساس الجسم المضاد أسهل تشريعياً. ويمكن أن يكون تطلب الوصول من قِبل الأجسام المضادة وحيدة النسيلة إلى ما لم تستطيع الأجسام المضادة المتعددة النسيلة التوصل إليه، أحد الأسباب التي أدت إلى الفشل الظاهر في التجارب القائمة على أساس الأجسام المضادة.

إن **التصوير** (Imaging) هو الحيّز الذي يمكن أن يقدم أداة التحليل التفصيلي للنظر داخل جسم الانسان بطريقة غير جراحية، وذلك من خلال دمج الأجسام المضادة وتوفر التقنيات الحديثة المضبوطة بالحاسوب فيه (أي في حيز التصوير). وبذلك، يمكن مثلاً الكشف عن الأجسام المضادة الموسومة بمشع المتمركزة على الورم بواسطة كاميرات غاما، وباستخدام سلسلة من الكواشف المتحركة، إذ يمكن للصورة الثلاثية الأبعاد أن تُطوَّر كنموذج حاسوب يُظهر بدقة موقع انعزال الأجسام المضادة الموسومة. هناك العديد من المشاكل المترافقة مع هذه التقنية: على سبيل المثال، بالنسبة إلى الأجسام المضادة ذات الألفة المعتدلة، هناك قسم منها فقط هو الذي يتمركز على المستضد، مع بقاء القسم الآخر غير مربوط. كما يتم أخذ بعض الجسم المضاد في بعض الأنسجة بشكلٍ غير نوعي أو حتى نوعي بواسطة مستقبلات Fc ومستقبلات الكربوهيدرات أيضاً. في هذه التقنية، يتم القيام بجولة الطريقة الواحدة لتصوير نظيرين من الأجسام المضادة.

يجري اختيار أحدهما ليكون نوعياً للمستضد، مثلاً المستضد المترافق للورم Tumour-associated antigen، أما الآخر فيكون ضابطاً موافقاً، ولكن من غير نوعية (انتقائية) تجاه المستضد. بعد ذلك، يمكن طرح الصورتين، واحدة من الأخرى، للحصول على صورة الربط النوعي فقط. بهذه الطريقة يبدو الجسم المضاد نوعياً أكثر ممّا هو في الحقيقة، إلا أنه يقدم أداة تشخيص ناجعة للبحث عن انتقالات ورمية ومثيلها من الأمراض الخبيثة.

علاج السرطان (Cancer therapy)، وهو أحد التطبيقات المتعارف عليها بين معظم الناس بأنه مرتبط بمفهوم الأجسام المضادة المسماة بـــ"الرصاصة السحرية"، وهو المصطلح المستخدم لوصفهم في الصحافة العامة والأخبار الإذاعية. والفكرة هي أن نوعية الجسم المضاد تسمح له باستهداف الخلايا الورمية لتحطيمها. وتقع المشاكل هنا في طيتين: أولاً، من الضروري تعيين نوعية (انتقائية) مناسبة مترافقة مع الورم، ثانياً، لا بد للجسم المضاد من أن يكون قادراً على توصيل بعض الأنواع من آلية التحطيم بالمستجيب إلى الخلايا الورمية. ليس من السهل تعيين المستضدات المرافقة أو النوعية للورم، والأمثال عليها حيث يمكن أن توجد هي عادةً على نحو أنه يجب إعداد جسم مضاد لكل مريض. وبذلك، إن الحالة القائمة في أغلب الأحيان هي أن خلايا الورم تكون مقاومة لأن تُقتَل بآليات المستجيب التي تعتمد على الجسم المضاد، مثلاً من خلال المتممات أو العمليات المثارة من قِبل تشابكات مستقبلات Fc. وهناك بعض الأمثلة التي يبدو فيها الجسم المضاد فعالاً على الأقل في نسبة من كل مريض ببعض الأنواع من الورم، مثلاً اللوكيميا والليمفوما، إلا أن هناك العديد من حالات الفشل في التجارب السريرية.

وكبديل عن آليات المستجيب الطبيعية في استهداف وتحطيم الخلية الورمية، حاول بعض العلماء قرن عوامل سامة أخرى بالأجسام المضادة. بشكلٍ واضح، يمكن لنظائر الجسم المضاد المشعة المتمركزة نوعياً بكمية عالية كفاية (الذي يزيد مع ألفة الأجسام المضادة، ونصف عمرها وسهولة اختراق النسيج) أن تقوم بتوصيل جرعات إشعاع قاتلة إلى نسيج الورم. أما آخرون فقد جربوا قرن سموم

فعالة جداً بالأجسام المضادة، كالسموم النباتية ريسين Ricin، وأبرين Abrin وجيلونين Gelonin. بدورها تعمل هذه السموم بشكلٍ جيد ضد بعض المستضدات المستهدفة وعلى بعض أنواع الخلايا. ولكن، لا تزال المشاكل قائمة فيما يتعلق بالسمّيّة غير النوعية تجاه المريض إزاء درجة قتل الخلية الورمية. من جهة أخرى، يبدو أن هذه السموم مستمنعة جداً، وهي تثير على المدى المتوسط إلى الطويل الأمد، رد فعل قوياً للغلوبولين المضاد لمركب الجسم المضاد– والسم. وكتوجه بديل آخر، يمكن قرن الأجسام المضادة بأنزيمات تقوم بتحويل مادة غير سامة، دواء مساعد Pro-drug، إلى شكلٍ سام جداً، لكنه قصير العمر وفعّال في مكان تمركز الورم. وسوف أناقش كيف أن مجموعة التذكر أي جهاز المتممات يعمل. إن المشكلة المشتركة في جميع هذه الاستراتيجيات هي أن درجة تمركز الورم دقيقة وحرجة. فليس من المرغوب أن يكون الكثير من الأجسام المضادة يجول خلال الجسد ويثير السمية بشكلٍ غير نوعي في الأنسجة الأخرى. ومن المفارقات، فإن آليات المستجيب الطبيعية تنشأ لتعمل بالتحديد تحت هذه الشروط، أي عند الزيادة في كمية الجسم المضاد. إذ تعوّل هذه الآليات بصورة رئيسية على توالي انخفاض الألفة، وارتفاع الشره وهي الخطوات التي تميز المعقدات المناعية عن الجسم المضاد الحر.

لقد أحرزت العلاجات القائمة على استخدام الأجسام المضادة بعض النجاح في حيز واحد، وهو الاستهداف النوعي للخلايا المشاركة في الوظائف المناعية وبذلك إنشاء حالة من **الكبت المناعي** (Immuno suppression). لقد استُخدمت الأجسام المضادة في استهداف جميع المجتمعات من الخلايا كالليمفاويات، أو سلالات محددة كالليمفاويات التائية، أو تفعيل مستضدات مُعبَّر عنها فقط من قِبل مجتمعات فرعية أصغر من الخلايا مثل تلك التي تعبّر عن مستقبلات سيتوكين cytokine معينة. لقد كانت تهدف الاستراتيجيات المبكرة إلى قتل هذه الخلايا إما من خلال استخدام آليات المستجيب الطبيعية المعتمدة على الجسم المضاد أو من خلال استخدام السموم المناعية. أما مؤخراً، فقد تم تحولٌ في العلاج

بالأجسام المضادة نحو استخدام أجسام مضادة مجمِّدة لا تنضب. وقد أتى هذا من إدراك أن الخلايا تستجيب لإشارات مختلفة، وأن الطبيعة الأصلية للإشارات، مثلاً إذا ما كانت هذه الإشارات موصولة ببعضها البعض أم أنها مستقلة، بإمكانها أن تنتهي إما إلى خلايا تترسب في تفاعل التهابي، أو كبديل عن ذلك، إلى خلايا تنظيمية من شأنها أن تخفف من ردة الفعل. ومن خلال استخدام الأجسام المضادة التي تجمِّد العمليات الخلوية الطبيعية، فإنه من المتأمل أن يكون بالامكان إعادة برمجة الخلايا في التفاعلات المناعية الذاتية لإيقاف التفاعل ضد الذات، وعلى نحوٍ مشابه، يمكن أن يجري تعليم الجهاز المناعي على تقبّل الزرع الغريب.

تتطلب وظائف التجميد هذه بأن تبقى الأجسام المضادة قادرة على الربط بالمستضد غير أنها يجب ألا تفعّل المتممات أو تثير مستقبلات Fc الموجودة على خلايا المستجيب. يمكن تحقيق مثل هذه الخصائص من خلال تعديل تسلسلات في المناطق الثابتة للجسم المضاد معروفة بأنها دقيقة وحاسمة في ظائفه الفردية. وكخطوة إضافية على هذه الاستراتيجيات، يتم بناء الجزيئات الخيميرية، حيث إن الخلايا التي تشفر لمناطق Fc من الأجسام المضادة يتم دمجها مع جينات تشفر لقطاعات من مستقبلات السيتوكين أو جزيئات الالتصاق من أجل ابتكار الالتصاقات المناعية. ومع أنها تقوم باستبدال المنطقة المتغيرة من الجسم المضاد إلا أن هذه القطاعات تبقى تؤمن تعرفاً نوعياً جداً على الرابط. أما منطقة Fc فتؤمن لجميع الجزيء تكافؤاً متعدداً وأيضاً نصف عمر أطول.

كما ذُكر أعلاه، تكمن إشكالات استخدام الأجسام المضادة في الحي في الزمن المستغرق لتطويرها، وإجراء التجارب السريرية عليها الذي يتطلب العديد من السنوات. لذلك هناك العديد من الأجسام المضادة في المراحل الأخيرة من التجارب السريرية اليوم هي قائمة على أفكار علمية ربما منذ عشر سنوات أو أكثر. وبالتالي، سيكون هناك العديد من السنوات قبل أن تجد بعضاً من الأفكار الأحدث في علم المختبر طريقها إلى الجيل الثاني من التجارب السريرية.

Further reading — 12.25 قراءات إضافية

Antibody Engineering, vol. 65, *Chemical Immunology*, edited by J. D. Capra. Basel; London; New York: Karger, 1997.

Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne, and J. Kuby, *Immunology*, 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2003.

Harris, W. J. and J. R. Adair, (eds.), *Antibody Therapeutics*. New York; London: CRC Press, 1997.

Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlonchik, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed. New York: Garland Science, 2001.

King, D. J. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. London: Taylor and Francis, 1998.

Kontermann, R. and S. Dubel (eds.), *Antibody Engineering*. Berlin: Springer-Verlag, 2001.

Parham, P. *The Immune System*, 2nd ed. New York: Garland Science, 2004.

ثبت المصطلحات
عربي ـــ انجليزي

English	عربي
2-Propanol	2- بروبانول
2-oxoglutarate	2-أوكزوكلوتريت
2,3 butanediol	2، 3 بوتانيدول
4-Butyrobetaine	4-بيوتيروبيتاين
4-nitrophenyl-â-acetyllactosamine	4-نيتروفينيل -بيتا-أسيتيل اللاكتوز الأميني
5-Hydroxypyrazinecarboxylic acid	5- هيدروكسي بيرازين حمض الكربوكسيل
5-cyanovaleramide	5-سيانوفاليراميد
6-aminopenicillanic acid	6-أمينو حمض البينيسيلانيك
3’ Exonuclease	إكزونيوكلييز على طرف ’3
2,3-enoyl-Co A hydratase	أنزيم إضافة ماء على 2، 3 إنيول ـ كو A
3-hydroxyacyl-Co A dehydrogenase	أنزيم المزيل هيدروجين من 3-هايدروكسيل أسيل كو A
3- Phosphoglycerate kinase	أنزيم فسفرة الكليسيرايت 3-فوسفات
β-carotene	بيتا - كاروتين
α-mating factor	عامل التزاوج α
5-member nucleus	نواة خماسية الحلقة
2,3-dideoxynucleotide	نيوكليوتايد منقوص ذرتين أوكسيجين من الكربون 2 و3 - داي ديوكسي نيوكليوتايد
2-Deoxynucleotides	نيوكليوتايد منقوصة الأوكسيجين على الكربون الثاني
Abacavir	الأباكافير
Glyceraldehyde 3 phosphate	3-فوسفات الغليسرالديهايد

Target DNA	الـ DNA المستهدف
Passenger DNA	DNA راكب أو منقول
Recombinant DNA	DNA مأشوب
cDNA (Complementary DNA)	DNA مُكمِّل متمم
N-acetyl glucosamine	N- أسيتيل غلوكوزامين
n-alcane liquid	n ـ ألكين سائل
Real time PCR (RT-PCR)	الـ PCR بالوقت الحقيقي
Ribosomal RNA	RNA الرايبوزومي
RNAi	الـRNA المتدخل
Messenger RNA (m-RNA)	RNA رسول
S-2 Chloropropionic acid	S-2 حمض كلوروبروبيونيك
V_H	V_H (قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الثقيلة)
V_L	V_L (قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الخفيفة)
α-amylases	α أميلاز
Fluid granulation towers	أبراج تحبيب السوائل
Spores	أبواغ
Apovaricin	أبوفاريسين
Mumps	أبوكعب
Sense	اتجاه إعتيادي
Oxygenation	اتحاد مع الأوكسجين
Automation of DNA Sequencing	أتمتة عملية سَلسَلة الـ DNA
Ethylene glycol	إثيلين كليكول
Agrobacterium tumfacien	الأجرعية المورمة
Occlusion bodies	أجسام إحاطة
Monoclonal antibody	الأجسام المضادة وحيدة النسيلة
Inclusion bodies	أجسام ضمنية أو حويصلية
Humanised antibodies	أجسام مضادة مؤنسنة
Fluid mechanical stress	إجهادات ناجمة عن ميكانيكية السوائل
Single-stranded	أحادي الجديلة

Monosaccharide	أحادي السكاريد
Haploid	أحادي المجموعة الصبغية
Global worming	الاحتباس الحراري
Lattice entrapment	الاحتجاز بالشبيكة
Probability	احتمال
Vortexing	إحداث الدوامات
Amino acids	أحماض أمينية
Aliphatic amino acids	أحماض أمينية مفتوحة
Fatty acids	أحماض دهنية - أحماض شحمية
polyunsaturated fatty acids	أحماض دهنية غير مشبعة متعددة
Organic acids	أحماض عضوية
Nucleic acids	أحماض نووية
Continuously stirred tanks	أحواض مستمرة التحريك
Protein-DNA binding assays	اختبارات ارتباط البروتين مع الـ DNA
Clinical trials	الاختبارات السريرية
Enzyme assay or immunodetection	اختبارات كشف أنزيمية أو مناعية
Reduction	الاختزال
Free-energy reduction	اختزال حر الطاقة
Binding groove	أخدود الربط
Genethics	أخلاقيات الهندسة الوراثية
Oxo-functonality	الأداء الوظيفي oxo
Federal Drug administration (FDA)	إدارة الدواء الاتحادية
Adrenodoxin	الأدرينودوكسين
Adsorption	الادمصاص، الالتصاق
Adenine	أدنين
Adiponitrile	أديبونايترايل
cAMP	أدينوزين حَلَقي أحادي الفوسفات
Adenosine monophosphate	أدينوسين أحادي الفوسفات
ATP	أدينوسين ثلاثي الفوسفات
Adenosine diphosphate	أدينوسين ثنائي الفوسفات

Arabinanases	أرابيناناز
Arabinose	أرابينوز
Linkage	الارتباط
Gene linkage	الارتباط الجيني
n-glcosylation	ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت
O-glycosylation	ارتباط الغلايكوزيل بالأوكسيجين
Linear correlation	ارتباط خطي
Recircularisation	إرجاع إلى شكل دائري
Arginine	أرجينين
Archaea	أركيا
Fibroblast	الأرومة الليفية
Erythropoietin	الإريثروبوتين
Erythromycin	إريثرومايسين
Arenes	الأرين
Deacetylated	إزالة مجموعة الاسيل
Dimorphism	ازدواجية الشكل
Base pairs	أزواج القواعد
Azoles	الأزول
Azethromycine	أزيثرومايسين
Builders of detergents	أساس المنظف
Asparagine	أسباراجين
Aspartate	أسبارتات
Asparaginase	الأسبارجيناز
Site-specific integration/excision	استئصال ودمج في موضع محدد
Acetate	أستات
Istaxanthin	استازانتين
Cell retention	استبقاء خلوي
Transponation	الاستجابة
Secondary immune response	استجابة المناعة الثانوية
Immune response	الاستجابة المناعية

Light detection	استجلاء الضوء
Saccharification	الاستخلاص الصناعي للسكر، تحويل الكربوهيدرات المعقدة إلى سكر
Fatty acyl-CoA esters	إستر أسيل كوانزيم A الشحمي
Esterase	الإستراز
Inter-esterification	الأسترة البينية
Recovery	استرجاع
Green replacements	الاستعاضات الخضراء
RSCU = synonymous codon usage Relative	استعمال شفرة ما ومرادفاتها
Applications	استعمالات، تطبيقات
Polarity	استقطاب
Excision	استقطاع استئصال
Sustainability	الاستمرارية والبقاء
Immunogenicity	استمناع
Multicellular organism cloning	استنساخ الكائنات المتعددة الخلايا
Acetyl coenzyme A	أستيل كو-انزيم A
Breeding	الاستيلاد
Basic biotechnology	أسس التقانة الحيوية
Gene silencing	اسكات الجين
Lithium acetate	أسيتات الليثيوم
Acetaldehyde	أسيتالديهايد
Acetamide	أسيتامايد
Acetone	أسيتون
Acetoine	أسيتوين
Expressed Sequence tag= EST	إشارة السلاسل المُعبَّرة
Translation signal	إشارة بدء الترجمة
N-terminal Signal peptide	إشارة ببتيد على طرف N
Signal peptide	إشارة ببتيدية
Derived	اشتُق، إستُنتِج

bands	أشرطة
Food irradiation	إشعاع او تشعيع الغذاء
X-ray	الأشعة السينية
Colloidal	أشكال غروانية أو غروية
Dyes	أصبغة
Amino acid sequence alignment	اصطفافات تسلسل لأحماض الأمينية
Artificially	اصطناعي
Hydroxylate	إضافة مجموعة الهايدروكسيل
Reading frame	إطار القراءة
Open reading frame (ORF)	إطار قراءة مفتوح
Extension	إطالة بالبلمرة
Terminal nucleotide sequence	أطراف تسلسلات نيوكليوتايدية
Overhangs	أطراف ناتئة
Cohesive ends = Cos Site	أطراف ناتئة قابلة للصق بموقع cos
Reoxidation	إعادة أكسدة
Arbitrary	اعتباطي
Set-up	إعداد
Agar	الآغار
Fouling flims	الأغشية المترسبة
Reactor-adapted membranes	أغشية متأقلمة مع المفاعل
Aflatoxin	أفلاتوكسين
Avoparicin	أفوباريسين
Ephedrine	الإفيدرين
Conjugation	اقتران
Suboptimal	أقل من المستوى المثالي
Acrylates	الأكريلات
Acrylamide	أكريلمايد
Expendase	إكسبنداز
Exon	إكسون
Aconitase	أكونِتيز

Albumin	الألبومين
Thermocycler	آلة الـ PCR
Translocon	آلة انتقال أو ترانسلوكون
Annealing	التحام
Improper folding	التفاف بروتيني غير سليم
Pneumonia	الالتهاب الرئوي
Hepatitis B	التهاب الكبد من النوع B
Rheumatoid arthritis	التهاب المفاصل الريثاني
Reckettisial infections	الالتهابات الريكيتيسية
Calcium alginate	الجينات الكالسيوم
Original single-site affinity	الألفة الأصلية للربط على صعيد موقعٍ واحد
Affinity	ألفة ، تآلف
Long chain alkanes	ألكاين ذات سلسله طويلة
Alkylation	الألكلة
Tropan alkaloids	ألكلويدات التروبان
Terminal alkenes	الألكينات الطرفية
Allele	أليل أو فردة
Patho mechanisms	آليات تطور الأمراض
Hollow fiber	الألياف المجوفة
Evolutionary mechanisms	آلية ومراحل التطور
Absorbance	الامتصاص الضوئي
Circular dichroism	امتصاص ضوء مستقطب دوراني
Optimize	أمثَلة
Infectious diseases	الأمراض المعدية
Antisera	أمصال مضادة
Polyclonal antisera	أمصال مضادة متعددة النسيلة
Amphotericin	الأمفوتريسين
Amoxicillin	الأموكزاسيلين
Ammonium	أمونيوم
Amide	الأميد

Amidase	الأميداز
Amikacin	الأميكاسين
Molar growth yield	إنتاج النمو المولي
Stoichiometric production	إنتاج متكافئ
Productivity	الإنتاجية
Volumetric productivity	الإنتاجية الحجمية
Volumetric productivity	الإنتاجية الحجمية
Interferon	أنترفيرون
Consensus interferon	انترفيرون متفق عليه أو إجماعي
Interleukin (IL)	إنترلوكين
Intron	إنترون
DNA Cloning	انتساخ الـ DNA
Gene cloning	انتساخ الجين
Shotgun cloning	الانتساخ الطلقي
Expression cloning	انتساخ تعبيري، كلونة تعبيرية
In-vitro cloning	انتساخ في الأنبوب أو في الزجاج
Passive diffusion	الانتشار السلبي
Natural selection	الانتقاء الطبيعي
Stereoselectivity	انتقائية فراغية
Regioselectivity	انتقائية موقعية
Oxygen transfer	انتقال الأوكسيجين
Metastasis	انتقالات ورمية
Anthocyanins	أنثوسيانينات
X-ray diffraction	انحراف الأشعة السينية
Linear regression	الانحسار الخطي
Solubility	انحلالية
Androstenedione	أندروستينيدايون
Coalescing	اندماج
Combination	اندماج، اتحاد
Cell fusion	الاندماج الخلوي

Restriction enzyme-mediated integration (REMI)	اندماج مُساعَد بأنزيمات الحصر
Protein fusion	اندماجات بروتينية
Endoglucanase	إندوكلوكانيز
Restriction endonucleases	إندونيوكلياز حصري
Frame shift	انزياح في إطار القراءة
Orotidine-5' phosphate decarboxylase	أنزيم إزالة الكربوكسيل من أوروتيدين 5' فوسفات
Histidinol dehydrogenase	أنزيم إزالة الهيدروجين من هيستيدينول
Acetamidase	أنزيم أسيتاميديز
Pyruvate carboxylase	أنزيم إضافة الكربوكسيل للبايروفات
Integrase (Int)	أنزيم الإندماج أو إنتغرايز
Taq polymerase	أنزيم البلمرة تاك
Chymosin	أنزيم التجبين (الكيموزين)
Aldolase	أنزيم ألدولاز
Specific aldolase	أنزيم الدوليز محدد
Alkaline phospatase	أنزيم الفوسفاتاز القلوي
Pyruvate dehaydrogenase	أنزيم المزيل للهايدروجين من البايروفات
Amylases	أنزيم أميليز محلل للنشاء
Glucose-6-phsphate isomerase	أنزيم إيزوميراز الغلوكوز 6-فوسفات
Triose phosphate isomerase	أنزيم إيزوميراز فوسفات الترايوز
RNA dependent-DNA polymerase	أنزيم بلمرة DNA يعتمد على قالب من الـ RNA
RNA polymerase	أنزيم بلمرة RNA، بوليمراز الـ RNA
DNA polymerase	أنزيم بوليميراز الـ DNA
DNA taq polymerase	أنزيم بوليميراز الـ DNA تاك
Adenylate cyclase	أنزيم تحلُّق الأدينيلايت أو أدنيليت سايكليز
Pyruvate-formate lyase	أنزيم تحليل البايروفات- فورمات
Galactosidase	أنزيم تحليل الكالاكتوز = β -كلاكتوسيدايز
Luciferase	أنزيم تحليل لوسيفرين أو لوسيفيرايز
Fatty acyl-CoA Synthase	أنزيم تصنيع أسيل كوA

ATP synthase	أنزيم تصنيع الـ ATP
Citrate Synthase	أنزيم تصنيع الستريت (سينثاز)
Formyl-tetrahydrofolate synthase	أنزيم تصنيع فورميل تتراهايدروفوليت
Topoisomerase	أنزيم توبويزمرايز
Carboxykinase phosphoenolpyruvate	أنزيم فسفرة 3 فوسفواينول بايروفيت كربوكسيل
Acetate kinase	أنزيم فسفرة أسيتايت
Acetyl kinase	أنزيم فسفرة الأسيتيل
Pyruvate kinase	أنزيم فسفرة البايروفات
Protein kinase	أنزيم فسفرة البروتين أو بروتين كايناز
Butyrate kinase	أنزيم فسفرة بيوتيريت
Phospho Fructokinase	أنزيم فسفرة فسفات الفركتوز
Phosphoglycerol kinase	أنزيم فسفرة فوسفوغلسيرول
Phosphofructokinase	أنزيم فسفرة فوسفوفركتوز، فوسفوفركتوكايناز
Succinate thiokinase	أنزيم فسفرة كبريتية للسكسينات
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	أنزيم فسفرة كربوكسيل الفوسفواينول بايروفات
Nucleotide diphosphate kinase	أنزيم فسفرة نيوكليوتايد ثنائي الفوسفات
Phosphoglycero mutase	أنزيم فوسفو غليسيروميوتاس
Phosphatase	أنزيم قطع (إزالة) الفوسفات
Alkaline Phosphatase	أنزيم قلوي لتحليل الفوسفات = ألكلاين فوسفاتاز
Ligase	أنزيم لصق الـ DNA، ليغاز
Fatty acyl-CoA Oxidase	أنزيم مؤكسِد أسيل كو A
Alkaline protease	أنزيم محلل بروتيني قاعدي أو قلوي
Isocitrate lyase	أنزيم مُحلِّل شبيه الستريت
Protease/proteolytic enzyme	أنزيم محلل للبروتين، بروتياز
Phosphogluconate dehydaratase	أنزيم مزيل الماء من الفوسفوكلوكنات
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	أنزيم مزيل الهايدروجين عن غليسيرالديهايد ثلاثي الفوسفات
Phosphogluconate dehydrogenase	أنزيم مزيل الهيدروجين من فوسفوغلوكونات

Phosphoenol pyruvate dehydratase	أنزيم مزيل للماء من الفوسفو اينول بايروفات
Glucose -6- phosphate dehydrogenase	أنزيم مُزيل للهيدروجين من (ديهايدروجيناز) الغلوكوز 6-الفوسفات
Formate dehydrogenase	أنزيم مزيل هايدروجين من الفورميت
Oxogluconate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من 2-اوكسوغلوكونات
Fatty acyl-CoA dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من اسيل كوA الشحمي
Succinate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من السكسينات
Malate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من الماليت
Isocitrate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من شبيه الستريت
Malate Synthase	أنزيم مُصنِّع ماليت
Endonucleases	أنزيمات اقتطاع نيوكليوتيدي داخلية (إندونيوكلياز)
Oxygenases	أنزيمات الاتحاد مع الأوكسجين
Acylating enzymes	أنزيمات الأسْيلة
Modification enzymes	أنزيمات التغيير
Restriction enzyme	أنزيمات التقييد أو الحصر
Cephalosporinase	أنزيمات السيفالوسبوريناز
Exopeptidase	أنزيمات بيبتيداز خارجية
Endopeptidase	أنزيمات بيبتيداز داخلية (إندوبيبتيداز)
-lactamase	أنزيمات بيتا لاكتاماز
Mono or dioxygenases	أنزيمات تضيف ذرة أو ذرتين من الأوكسجين
Autocatalytic enzymes	أنزيمات محفزة ذاتياً
Nucleases	أنزيمات مُحلِّلَة للحمض النووي ـ نيوكليايز
Carbohydrase	أنزيمات محللة للكاربوهيدرات أو كاربوهيدرايز
Foldases	أنزيمات مساعدة للالتفاف
Cross-linked enzymes (CLEs)	أنزيمات مشبوكة
Cross-linked spray-dried enzymes (CSDEs)	أنزيمات مشبوكة مجففة بالترذيذ
Draw back	انسحاب
Plug flow	انسياب مُقنَّن
Folding	انطواء – التفاف

Baculovirus expression vector system (BEVS)	أنظمة نواقل التعبير من الفيروس العصوي
Dissociation	انفصال الجدلتين عن بعضهما البعض
Segregated	انفصالي
Dialysis	الانفكاك
Meiosis	الانقسام الاختزالي
Binary fission	انقسام شطري
Mitotic division	انقسام فتيلي أو خيطي
Cell shrinking	انكماش الخلية
Breaking self-tolerance	انهيار التحمل الذاتي
Microtubulin	الأنيبيبات
Ellipse	إهليج، بيضوي
Operon	أوبرون
Augmantin	الأوغمانتين
Ofloxacin butyl ester	أوفلوكساسين بيوتيل الإستر
Oxazolidinones	الأوكزازوليدونونات
Oxa cephams	الأوكزاسيفامات
Oxalate	أوكزالايت
Oxaloacetate	أوكزالوأستات
Oxytetracyclin	الأوكزيتتراسايكلين
Auxins	أوكزينات
Oxidase	أوكسيداز
Initial	أولي، أساسي
Primer oligonucleotides	أوليغونيوكليوتايد بادئ التفاعل
Ethanol	إيثانول
Ethane g	إيثاين غاز
Crown ethers	الإيثير الإكليلي
Gram-positive	إيجابية الغرام
Isooctane	الأيزوأكتان
Isomerase	أيزومراز

Secondary metabolism	الأيض (الاستقلاب) الثانوي
Endogenous metabolism	الأيض الداخلي
Sugar over-flow metabolism	أيض السكر المفرط الجريان
Anaerobic metabolism	أيض أو استقلاب لاهوائي
Propodium iodide	أيوديد البروبوديوم
Ion	أيون
sulphide ion	أيون اسلفايد
Sulphate ion	أيون السلفات
Papain	البابابين
Nested primers	بادئات تفاعل للتعشيش
Pro insulin	بادئة الانسولين
Yield exclusive maintenance	باستثناء عطاء البقاء
Bacitracin	الباسيتراسين
Palindromic	باليندرومك = تسلسل معكوس يُقرأ بنفس الطريقة على الجدلتين
Pyrophosphate PPi	بايروفوسفات غير عضوي
Pyrimidine	بايريميدين
Biotin	بايوتين
Linear polypeptide	ببتيدات متعددة خطية
Basic research	البحث العلمي الأساسي
Top-spray	بخاخات علوية
Software	البرامج الحاسوبية
Strain improvement programs	برامج تحسين السلالة
Warping software	برامج حاسوبية للمطابقة
Fluid dynamic modeling	برامج نمذجة ديناميكية سائلة
Computer soft ware	برمجيات
Propanol	بروبانول
Propanediol	بروباين ديول
Propane g	بروباين غاز
Propionate	بروبيونات

Propionic	بروبيونك
Globular protein	بروتن كروي
Protoplast	بروتوبلاست
Protocol	بروتوكول
Channel protein	بروتين القنوات
Catabolite receptor protein-CRP	بروتين المستقبل لمنتجات الهدم
Green fluorescent protein	البروتين ذو الفلورة الخضراء، بروتين أخضر مشع - مضيء أو فلوري او فلوروسيني
Carrier protein	بروتين عتَّال، حامل
Crystal protein	بروتين متبلور
Catabolite activator protein-CAP	بروتين محفِّز منتجات الهدم
PutativeProtein	بروتين مفترض
Lipoproteins	البروتينات الدهنية
Regulatory protein	بروتينات الضبط والتنظيم
Adaptive proteins	بروتينات تكيفية
High value proteins	بروتينات عالية القيمة
Glycol proteins	بروتينات غلايكول
Chaperones	بروتينات مرافِقة
Fusion proteins	بروتينات مندمجة
Nucleoprotein complexes	بروتينة مع أحماض نووية
Proteome	بروتيوم- مُجمل بروتينات الخلية
Prochem	بروخم
Proline	برولين
Prions	البريونات
Proportional	بشكل تناسبي
Hyperbolic	بشكل مفرط
Finger print	بصمة
Northern blotting	بصمة نورثرن
Energy dissipation	بعثرة الطاقة
Agrobacterium	بكتيريا أجرعية التدرن، أغروبكتيريا

Enterobacteria	البكتيريا الداخلية
Lactic acid bacteria	البكتيريا اللبنية
Propionibacterium	بكتيريا بروبيوني
Eubacteria	بكتيريا حقيقية
Obligate bacterial parasites	بكتيريا مُجبرة على التطفل
Sulphate reducing bacteria	بكتيريا مختزلة للسلفات
Methanogenic bacteria	بكتيريا مولِّدة للميثان
Bacteriocins	البكتيريوسينات
Pectinases	بكتيناز
Bulk	بكمية كبيرة
Plasma	بلازما
Plasmid	بلازميد
Conjugative plasmid	بلازميد الاقتران
Mega-plasmids	بلازميدات عملاقة
Mobilisable plasmids	بلازميدات مُحرَّكَة
Cross-linked enzyme crystals-CLECs-	بلورات أنزيم مشبوكة
Mediated	بمساعدة، يساعد في عملية
Biosynthesis	البناء أو التصنيع أو التمثيل الحيوي
Bentonite	البنتونيت
Benzene	بنزين
Penicillin acylases	بنسلين أسيلاز
Microtubular structure	البنية الأنيبيبية
Tertiary structure	البنية الثالثة
Fusion construct	بنية اندماجية
Secondary structures	بنية ثانوية
Penicillium chrysogenum	بنيسيليوم كريسوجينم
Porphyrins	بورفايرين
Spore	البوغة
Polyethylene glycol (PEG)	بولي إثيلين كليكول

Polyacrylate	بولي الأكريلات
Polyphenols	البولي الفينول، عديد الفينول
Poly-butyrate	بولي هيدروكسي بيوترات
Polyurethane	بولي يوريثان
Polyenes	البوليئينات
Microenvronment	البيئة الدقيقة
Peptidoglycan	البيبتدوغلايكان
Cyclic peptides	بيبتيدات حلقية
Glycopeptides	بيبتيدات سكرية
Beta-galactosidase	بيتا-غلاكتوزيداز
	بيتا-لاكتام
Pyranoses	بيرانوز
Pyrovate	بيروفات
Peroxidases	بيروكسداز
Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين
Peroxidase/Catalase	بيروكسيدايز/ كاتاليز
Peroxisome	بيروكسيسوم
Picoline	بيكولين
penam	بينام
Benomy	بينومي
Penicillins	بينيسيلينات
Butanol	بيوتانول
Butanediol	بيوتاين ديول
Butyryl-CoA	بيوتريل كوانزيم A
Butyrate	بيوتيريت
Purines	بيورين
Glycobiology	البيولوجيا الغلاكوجية
Steric effect	تأثيرات الشكل والفراغية
Tartrate	تارترات
Recombination	تأشيب

Meiotic recombination	التأشيب الانتصافي
Double cross-over recombination for allele replacement recombination	التأشيب التقاطعي المزدوج لاستبدال الفردة
Genetic recombination	التأشيب الجيني
Natural recombination	التأشيب الطبيعي
Homologous recombination	التأشيب المتناظر أو المتماثل أو المتجانس
Double cross-over recombination	تأشيب تقاطعي (عبور) مزدوج
Single cross-over recombination	تأشيب تقاطعي أو تصالبي منفرد
Tagging	تأشير، وسم
Biodegradable	تآكل وتفكك حيوي
Tyrosine	تايروسين
Ionization	التأين
Reciprocal	تبادلي
Gibbs energy dissipation	تبدد الطاقة عند جبس
Site-specific transposition	التبديل في الموقع المحدد
Staining	تبقيع، تلوين
Sporulation	التبويغ
Mutant complementation	تتام تكملة الطفرات
Switch to	تتحول
Chromogenic	تتحول لمادة ملونة
Heterotrophic	تتغذى على مواد عضوية
Feedback inhibition	التثبيط الارتجاعي
Carbon catabolite repression	التثبيط بمركبات هدم الكربون
Catabolite repression	تثبيط بمنتج الهدم أو التثبيط بالمركب الناتج من عمليات الهدم
Catabolic repression	تثبيط عمليات الهدم
Empirical	تجريبية
Deep vein thrombosis	تجلط الدم في الأوعية العميقة
Stimulons	تجمع مورثات ذات تحفيز مشترك
Regulons	تجمع مورثات ذات ضبط مشترك

Gene fusion	التحام الجينات - صهر جيني
Substrate concentration gradient	تحدر في تركيز المركب الأولي
Metabolic fingerprinting	تحديد بصمة الأيض
Food allergies	التحسس أو الحساسية للأطعمة
Incubate	تحضين
Lysis	تحلل
Proteolysis	التحلل البروتيني
Elemental analysis	التحليل الأولي
Analysis of the proteome	تحليل البروتيوم (كل بروتينات الخلية)
Glycolysis	تحليل الغلوكوز - غلايكوليزس
Regime analysis	تحليل النظام
In silico analysis	تحليل بواسطة البرامج المعلوماتية أو إنسيليكو
In-silico analysis	تحليل بواسطة البرامج المعلوماتية أو إنسيليكو
Hydrolysis	تحليل مائي
Multi-variant analysis	تحليل متعدد المتغيرات العشوائية
Self-tolerance	التحمل الذاتي
Tern over	تحول
Conversion	تحوّل
Shift	تحوّل (انزياح)
Biolistic transformation	التحوير بالقصف
Transformation	التحويل
Integrative transformations	التحويل الإندماجي
Cell transformation	التحويل الخلوي
Fungal transformation	تحويل الفطريات
Oxidative conversion	التحويل بالأكسدة
Biotransformation	تحويل حيوي
Transformation genetic	تحويل وراثي
Pentose phosphate shunt	تحويلة البنتوز المفسفر
Hexose monophosphate shunt	تحويلة الهكسوز أحادي الفوسفات

Clearance	التخلص، التنقية
Fermentation	التخمير
Leavening	تخمير
Parameter estimation	تخمين قيم المعايير
Interferences	تداخلات (تشويش)
Genome management and analysis	تدبير الجينوم وتحليله
Gradient	تدرج
pH gradient	تدرج في درجة الحموضة
electrical gradient	تدرج كهربائي
Crawn gall	التدرن التاجي
Flux	التدفق
Metabolic Flux	تدفق الأيض
Outflow	التدفق الخارج
Inflow	التدفق الداخل
Glycolytic flux	تدفق مسار تحليل السكر
Diazotization	التدييز
Master cell bank hierarchy	تراتبية بنك خلوي رئيسي
Accumulation	تراكم
Transketolase	ترانس كيتولاز
Glycosyl transferase	ترانسفيراز الغلايكوزيل
Transcriptome	ترانسكوبتوم
Turbidostat	التربيدوستات
Diterpenes	التربينات الثنائية
Translation	ترجمة
Frequency of transcription initiation	تردد ابتداء عملية النسخ
High frequency = Hfr	تردد عالٍ
Immunoprecipitation	الترسيب المناعي
Ultra filtration	ترشيح فائق، فلترة فائقة
Filtration	ترشيح، فلترة

Standard composition	تركيب نمطي معياري
Anabolism	التركيب والبناء
Concentration	التركيز
Titers	تركيز المنتج
Synteny	التزامل
Gravitational acceleration	التسارع الجذبي
Western blot	التسرب اللطخي بطريقة ويستيرن، وصمة ويسترن
Signal sequence	تسلسل الإشارة
Pro-sequence	التسلسل الأولي
Genome sequence	التسلسل الجيني الكامل
Complement cascade	تسلسل المتممات
Upstream activation sequence (UAS)	التسلسل المُحفز في أعلى الموقع
Upstream repression sequence (URS)	تسلسل مثبط في أعلى الموقع
Normalize	تسوية
Cross-linking	تشابك
Forward angle light scatter (FALS)	تشتت الضوء بزاوية أمامية
Right angle light scatter (RALS)	تشتت الضوء بزاوية قائمة
Cleavage	تشطر
Fragmentation	تشظي (تكسير)، تشديف
Formation	تشكيل
Isomerization	تصاوغ (تزامر)
Clarification	تصفية
Alignment	تصفيف
Solidification	تصليب
Enantiomers resolution	تصميم مركبات المصاوغة المرآتية
Directed or hybrid biosynthesis	التصنيع الحيوي المُوجه أو المهجن
Microfabrication	التصنيع المجهري الدقيق
Autoradiography	التصوير الشعاعي الذاتي
Video/Photomicroscopy	تصوير الفيديو المجهري
Formulation	تصييغ، تشكيل المستحضرات

Replication	تضاعف - المضاعفة
Multiplicity of infection	تضاعف الإصابة
Autonomous replication	التضاعف الذاتي المستقل
Amplification	تضخيم مضاعفة أو تكثير عدد النُسخ
Site direct mutagenesis	التطفير الموجّه في الموقع
Insertional Inactivation	التطفير بزرع قطعة من DNA في الجين بحيث يتغير التسلسل ويعطل الجين
Somatic mutation	تطفير جسمي
Point mutation	تطفير موضعي أو نقطي
Clinical development	التطوير الدوائي
Chain elongation	تطويل السلسلة
Primer extension analysis	تطويل بادئ التفاعل
Differential Interference Contrast	تعاكس التداخل التبايني
Phase contrast	تعاكس الطور
Expression	التعبير
Gene expression	التعبير الجيني
Localized expression	تعبير موضعي
Anchorage dependent	تعتمد على توفر مرسى
Transfection	التعداء
Poly unsaturated	تعدد عدم الاشباع
Polyploidy	التعددية الصبغية
Genetic modification	التعديل الوراثي
Post-transcriptional modifications	تعديلات ما بعد النسخ
T-cell antigen-specific recognition	تعرف نوعي بالمستضد من قبل الخلية التائية
Half-inactivation	تعطل الفعالية النصفي
Deactivation	تعطيل
Sepsis	تعفن الدم
Model’s complexity	تعقيد النموذج
Fed-batch feeding	التغذية على دفعات
In vitro packaging	تغليف بغلاف فيروسي في الزجاج

Microencapsulation	تغليفات دقيقة
Hyper-variability	تغير مفرط
Redox half reaction	تفاعل الأكسدة والاختزال أو الخزلدة النصفي
Forward reaction	التفاعل الأمامي
PCR	تفاعل البوليميراز التسلسلي
Backward reaction	التفاعل العكسي
Ag-Ab interaction	التفاعل المتبادل بين المضاد والمستضد
Bayer-Villiger reaction	تفاعل من نوع Bayer-Villiger
Anaphylactic shock	تفاعل مناعي تحسسي حاد
Redox	تفاعلات اختزال وأكسدة، خزلدة
β-oxidation	تفاعلات الأكسدة بيتا
Oxidative phosphorylation	تفاعلات الأكسدة والفسفرة
Substrate-level phosphorylation	تفاعلات الفسفرة على مستوى المواد الأولية
Photolithography	تفاعلات بالرسم الضوئي
Assembly reaction	تفاعلات تركيب
Fuelling reaction	تفاعلات تزويد بالوقود
Immunodiffusion reactions	تفاعلات تقنية الانتشار المناعي
Functional cross-reactions	تفاعلات وظيفية متقاطعة
Intercept	تقاطع
Cross-Over	التقاطع - عبور
Site-specific cross-over	تقاطع أو تصالب في مواقع محددة
Biotechnology	التقانة الحيوية
Glycobiotechnology	التقانة الحيوية الغلايكوجية
DNA array technology	تقانة مصفوفة الـ DNA
Minimizing the sum of squared errors	تقليل مجموع تربيع قيم الخطأ
Enrichment techniques	تقنيات الاخصاب
Electrofusion techniques	تقنيات الاندماج الكهربائية
High throughput technologies	تقنيات ذات الدفق العالي
Two-site ELISA	تقنية ELISA ذات الموقعين
Directed evolution technology	تقنية التطور الموجه

Genomic	تقنية الجينوم
Flow cytometry	تقنية قياس الانسياب الخلوي
Immobilization	تقييد الحركة
Protein aggregation	تكتل البروتينات
Aggregation	تكتل، تجمع
Cross-linked enzyme aggregates-CLEAs-	تكتلات أنزيم مشبوكة
Acylion condensation	التكثف لإستر الكربوكسيليك
Catabolism	التكسير والهدم
Complementation	التكملة أو التتام
Genetic complementation	التكملة أو التتام الجيني
Complementation of defect in the cloning host	تكملة نقص في خلايا المضيف
Genetic manipulation	التلاعب الجيني، الوراثي
Micromanipulation	التلاعب الدقيق
Flocculation	تلبيد
Inoculation	تلقيح
Telithromycine	تليثرومايسين
Cell-to-cell contact	التماس الخلوي
Differentiation	التمايز – التخصص
Cell elongation	التمدد الخلوي
Modeling exercise	تمرين النمذجة
Gene disruption	تمزيق المورث
Immunisation	تمنيع
Xenoimmunisation	التمنيع التهجيني
Alloimmunisation	التمنيع المتباين
Osmolarity	التناضح
Transduction	التنبيغ
Cloning	تنسيل، إنتساخ، كلونة
Permeabilization	تنضيح أو جعل الخلايا منفذة أو ناضحة

Endogenous respiration	التنفس الداخلي
Bioprospecting	التنقيب الحيوي
Necrosis	التنكرز
Cardiac muscle necrosis	تنكرز (نخر) عضلة القلب
Biodiversity	التنوع الحيوي
Sinusities	التهاب الجيوب
Japanese encephalitis	التهاب الدماغ الياباني
Bronchitis	التهاب القصبات
ST Louis	التهاب سانت لويس الدماغي
Hybridisation	التهجين
DNA hybridization	تهجين الـ DNA
Plant breeding	تهجين النبات التقليدي
Mass balances	توازن الكتل
Balance of degree of reduction	توازن درجة الاختزال
Wine stabilization	توازن قوام النبيذ
Mass Balances for ideal bioreactors	توازنات الكتل في المفاعل الحيوي المثالي
Tension	التوتر
Dissolved oxygen tension	توتر الأوكسيجين المنحل أو المذاب
Surface tension	التوتر السطحي
Radial flow rushton turbines	توربينات ذات انسياب شعاعي
Rushton disc turbines	توربينات قرص روشتون
Upward-pumping axial flow turbine	توربينة ذات الانسياب المحوري والضخ الموجّه إلى أعلى
Trans-esterification	توزيع الجزيئات التبادلي
Optimazation	توفير الظرف الأمثل والعوامل الأفضل
Special combination	توليفة خاصة
Tetracyclines	التيتراسايكلينات
Monoterpenes	التيربينات الأحادية
Triterpenes	التيربينات الثلاثية
Terpenoids	تيربينويدات

Tyrocidins	التيروسيدينات
Tylosin	التيلوسين
Constant	ثابت
Dissociation constant	ثابت التفكك - ثابت الانفصال
Temperature-stable	ثابت حرارياً
Km	ثابت سرعة فعالية الأنزيم النصفية
Dielectric constant	ثابت عزل الكهرباء
Normal chemical rate constant	ثابت معدل كيميائي طبيعي
Thymine	ثايمين
Thioester	ثايوإيستر
Thermostability	الثباتية الحرارية
Thrombin	ثرومبين
Threonine	ثريونين
Electroporation	الثقب الكهربائي
Triacylglycerols	ثلاثيات أسيل الغليسيرول
Lysyl residues	ثمالات الليزيل
Residues	ثمالات، بقايا
Diisocyanates	ثنائي إزوسيانات
Dimer	ثنائي الجزيئة (جزيئتان مرتبطتان بأصرة هيدروجينة)
Bicyclic	ثنائي الحلقة
Bisacrylates	ثنائي الساكريلات
Diploid	ثنائي الصيغة الصبغية
Dimethyl sulfoxide	ثنائي ميثيل السلفوكسيد
Cell wall	جدار خلوي
strand	جديلة، شريط
Antiparallel strand	الجديلة المضادة التوازي
Conserved strand	جديلة قديمة محفوظة
Aquaphilicity	جذب الماء
Hairy roots	الجذور الشعَرية

Graphite	الجرافايت
Outlet flow	الجريان في المخرج
Supernatant	الجزء الطافي
Fc region	الجزء القابل للتبلور
cell fraction	جزء محدد في الخلية
Circular DNA molecule	جزيء DNA دائري - حلَقي
tRNA	جزيء الـ RNA الناقل
Single-chain precursor	الجزيء السالف وحيد السلسلة
Ligand	جزيء يتآلف ويرتبط مع آخر، رابط
Macromolecules	جزيئات كبيرة
Callus	جُسْأة، الكالوس
Antibody	الجسم المضاد
Antibody isotype	الجسم المضاد المتماثل
Golgi body	جسم غولجي
Particle	جُسيم
Transducing particles	جُسيم مُنبِّغ
Viral particles	جسيمات فيروسية
Reinforced core particles	جسيمات مقواة من الداخل
Anthrax	الجمرة الخبيثة
Translocase	جهاز الإفراز ترانسلوكاز
Capillary	جهاز شعري
Fluorimeter	جهاز قياس الفلورة
Guanine	جوانين
Core	جوهر، أساس، قلب الشيء
Gelatin	الجيلاتين
Gellan	الجيلان
Operator gene	الجين المُشغِّل
Gene	جين أو مورث
Structural gene	جين بنيوية
Pseudogene	جين كاذب

Reporter gene	جين مُخبِر
synthetic gene	جين مصنَّع
Selectable Marker gene	جين واسم قابل للانتقاء
Reporter genes	جينات الاخبار
Mobilization genes	جينات التحريك
Regulatory genes	الجينات التنظيمية
Acid genes	جينات تعمل في وسط حمضي
base genes	جينات تنشط في وسط قاعدي
Anti sense gene	جينات مضادة للتعبير
Virulence genes (Vir genes)	جينات مُمْرِضة
Antibiotic-resistance marker genes	جينات واسمة لمقاومة المضاد الحيوي
Genome	جينوم - مُجمل المعلومات الوراثية في الخلية
Bio-geochemical	جيوكيمياء الحيوية
Respiratory quotient = RQ	حاصل التنفس
Native state	حاصلة أصلية طبيعية
Chemostat	حالة الاستقرار الكيميائي - كيموستات
Hyphal	حالة الخيوط
Lysogenic cycle	حالة سبات أو حلقة مُنشِئة للانحلال
Hydrophilicity	حُب الماء
Beads	حبوب، بلي، خرزات، كريات صغيرة
Sepabeads	حبيبات Sepa
Granularity	حُبيبية
Pumice stone	حجر الخفان
Compartmentalization	الحجيرات المستقلة
Organelles	حجيرات أو عضيبات
Bacteriostatic	الحد من نمو البكتيريا
Double index	حرفان رمزيان
Kinetics	حركيات
Pharmacokinetics	الحركيات الدوائية
Product formation kinetics	حركيات تشكيل المنتج

Darwanian optimization algorithm	حساب الأمثلة الدارْوَني
Algorithms	حسابات
Ecologically sensitive	حساس بيئياً
Trichoplusa ni	حشرة دودة الملوف القياسة
Hops	حشيشة الدينار
Measles	الحصبة
Biocatalyst	حفاز/ محفز حيوي
Pulse naturtion	حفاظ على الشكل الطبيعي بأسلوب نبضي
Naturation	الحفاظ على طبيعتها، استعادة طبيعتها الأصلية
Oscillating electric field	حقل كهربائي متذبذب
Cell lysates	الحُلالة الخلوية
Supercoiling	حلزنة والتفاف الـ DNA على بعضه البعض، فائقة الالتفاف
Heterocyclic amine	حلقات غير متجانسة تحتوي على الآزوت
Modeling cycle	حلقة النَّمذجة
Lytic cycle	حلقة انحلالية
Pentose phosphate cycle	حلقة تفاعلات فوسفات البنتوز
Tricarboxylic acid cycle	حلقة حمض ثلاثي الكربوكسيل
Cyclic diphosphoester	حَلقي ذو رابط فوسفوإستير ثنائي
L- Aspartic acid	حمض الأسبارتيك -L
Amino-adipic acid	حمض الأمينو أديبيك
Pyruvic acid	حمض البايروفيك
Acetic acid	حمض الخل
Fumaric acid	حمض الفوماريك
Clavolanic acid	حمض الكلافولانيك
Lactic acid	الحمض اللبني
Malic acid	حمض الماليك
Formic acid	حمض النمل
HCl	حمض الهيدروكلوريك
Itaconic acid	حمض إيتاكونيك

Propanoic acid	حمض بروبيونيك
Butyric acid	حمض بوتيريك
Succinic acid	حمض سكسينيك
Unsaturated fatty acyl	حمض شحمي غير مشبع
Saturated fatty acyl	حمض شحمي مشبع
Gluconic acid	حمض كلوكونيك
Adenvirus	الحمى الغدية
Epitopes	حواتم
Pharmacophores	حوامل الخاصة الدوائية
Protein carriers	حوامل بروتينية
Microcarrier	حوامل مجهرية
Endosomal vesicales	حويصلات إندوزومية
Vacuole	حويصلة
Lactating animals	الحيوانات الحلابة
Dairy animals	الحيوانات الحلوبة
Transgenic animals	الحيوانات المحورة وراثياً
Monogastric animals	حيوانات وحيدة المعدة
Extracellular	خارج خلوي
Extrachromosomal	خارجة عن الكروموسوم
Exogenous	خارجية المنشأ
Delayed release feature	خاصية الإطلاق البطيء
Metabolic bottle neck	خانقات الأيض
Similium	خباب من نوع الذلقاء
Physical map	الخرائط الفيزيائية
Restriction maps	خرائط حصرية
Transcriptional maps	خرائط نسخية
Output	خَرِج
Refraction properties	خصائص انكسار الضوء
Rheology	خصائص سريان الوسط الزرعي السائل
Clonal cell line	خط خلوي نسلي

Cell lines	خطوط خلوية
B-cells	الخلايا البائية
Macrophages	خلايا البلعمة الكبيرة
T-cells	الخلايا التائية
Activated, CD4-positive, T-helper cells	الخلايا التائية CD4+ المساعِدة المفعَّلة
Primate neural	خلايا الرئيسيات العصبية
Epithelia cells	الخلايا الظهارية
Antigen-presenting cells (APCs)	الخلايا العارضة للمستضد
Neutrophils	الخلايا العدلة السالفة
Dendritic cells	الخلايا المتشجرة
Transformant	الخلايا المُحورة التي تلقَّت الـ DNA، المتحولات
Mid-gut cells	خلايا المعي الوسطى
Myeloma	خلايا النخاع الورمية
Parental myeloma	الخلايا الورمية النخاعية الأبوية
Permeabilised cells	خلايا تم جعلها نفاذة
Embryonic stem cells	خلايا جذعية جنينية
Somatic cells	خلايا جسمية أو جسدية
Germ-line	خلايا جنسية أو تكاثرية، خط البذرة
Prokaryotic	خلايا ذات نواة أولية
Eukaryolic cells = eukaryotes	خلايا ذوات نواة حقيقية
Resting cells	خلايا في طور الراحة
Baby hamster kidney cells	خلايا كلى طفل الهامستر الصيني
Chinese hamster ovary cells	خلايا مبيض الهامستر الصيني
Hybridoma cells	خلايا ورمية هجينة
Phagocytes	الخلايا البلعمية
DNA shuffling	خلط الـ DNA أو التعامل معه
Daughter cell	الخلية الابنة
Parent cell	الخلية الأم
Pre-mix	خليط محضر مسابقاً

Pentamer	خماسي الأجزاء
Scurvy	داء الأسقربوط
Type I diabetes	داء السكري من النوع 1
Filarial	الداء الفيلاري
Gout	داء المفاصل
Hemophilia	داء الناعور
Daptomycin	دابتومايسين
Phytoalexins	الداحرات، الفيتوأليكسينات
Input	الداخل
In vivo	داخل الجسم، الحي
Intracellular	داخل خلوي
Buffer	دارئ أو محلول
High-shear impellers	دافعات الاحتكاك العالي
Low-shear impellers	الدافعات ذات الاحتكاك المنخفض
Impeller	الدافعة الميكانيكية (المسيّرة)
Function	دالة
Dioxygenase	داي أوكسيجيناز (ثنائي الأوكسيجيناز)
Diols	الدايول
Dienes	الدايينات
Pre-clinical studies	دراسات قبل سريرية
Proteomic	دراسة البروتيوم - بروتيوميك
Metabolomics	دراسة الميتابولوم، ميتابولوميك
DNA Sequencing	دراسة تسلسل الـ DNA ـ سَلسَلة الـ DNA
Higher-order aggregates	درجات أعلى من التكتلات
Order	درجة (ترتيب)، رتبة
Degree of reduction	درجة الاختزال
Entropy	درجة الاعتلاج - إنتروبي
Homology	درجة التشابه
Codon bias	درجة انحياز الشفرة
Carbon conversion coefficient	درجة تحويل الكربون

Well-defined	دقيق
Index	دليل
Therapeutic index	الدليل العلاجي
Peripheral blood	الدم المحيطي
Non-steroidal anti-inflamatory drug	دواء مضاد للالتهاب غير ستيرويدي
Pharmaceutical	دوائي
Spinner flask	دوارق دوارة
Spodoptera frujiperd	دود الخريف من فصيلة حرشفية الأجنحة
Autographa californica	دودة الفضة القيّاسية
Global carbon cycle	دورة الكربون الكونية
Light-dark cycle	دورة الليل والنهار
Turnover	دورة تصنيع-تكسير - دورة انقلاب
TCA	دورة حمض الليمون
Erlenmayer flask	دورق مخروطي (دورق إيرلنماير)
Shake flask	دورق هزاز
Doxycyclin	الدوكسيسايكلين
Non encapsulated	بدون كبسولة
Depsipeptide	ديبسيبيبتايد
Nematode	ديدان بدائية نيماتودية
Decarboxilase	ديكاربوكسيلاز
Decane	ديكان
Cyclodextrins	الديكسترينات الحلقية
Digoxygenin	ديكوكسيجنين
Thermodynamic	الديناميك الحراري
Dihydroxyacetone	ديهايدروكسي أسيتون
Autotrophic	ذاتي التغذية
Photoutotroph	ذاتية التغذي الضوئي
Drosophila melanogaster	ذبابة الخل
B-cell repertoire	الذخيرة الخلوية البائية
Chemiluminescent	ذو تفاعل كيميائي ضوئي

Polyunsaturated	ذو روابط مزدوجة متعددة
Bioactive	ذو نشاط حيوي
Constitutive	ذو نشاط دؤوب مستمر
Fusion tail	ذيل اندماجي
Poly A mRNA tail	ذيل متعدد الأدينين للـ RNA الرسول
Isopeptide bond	رابطة إيزوبيبتيدية
Disulphide bond	رابطة ثنائية سلفيد
Epoxy resins	راتنجات الإبوكسي
Resins	الراتنجات، ريزين
Racemic	راسيمي
Agonist	روابط تشاركية
Antagonist	روابط تضادية
Tetrapoid	رباعي الصيغة لبصبغية
Tetrahydrofuran	رباعي الهيدروفوران
Tetrasccharides	رباعيات السكاريد
Covalent binding	ربط تشاركي أو تساهمي
Lepidopteran	رتبة غمدية الأجنحة
Feed back	رجعي
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	الرحلان الكهربائي في الحقل النبضي
Two-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAG)	رحلان كهربائي ذو بعدين أو اتجاهين
Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	رحلان كهربائي في هلام بولي‌أكريلاميد مع SDS
Allergic response	رد فعل تحسسي
Packing	رزم، رص
Endonuclease Mapping	رسم خريطة قَطْع الإندونيوكلياز
Alkalophilic	رغبة في النمو في وسط قاعدي أو قلوي
Transplant rejection	رفض الجسم للأعضاء المزدرعة
Down pumping hydrofoil	رقاقات مائية ذات ضخ سفلي

Chip	رقاقة
plasma resonance	الرنين البلازمي
NMR	الرنين المغناطيسي النووي
C13-NMR	الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13
Robotics	روبوتي
Ribose	ريبوز
Ribonuclease	ريبونيوكلياز
Reductase	ريدكتاز
Washed out	زال
Xylose	زايلوز
Controlled pore glass	زجاج مضبوط الثقوب
Sub-cultures	زراعات مرحلية
Microbial Cultures	زراعة الأحياء المجهرية
Pharming	الزراعة الصيدلانية
steady-state continuous-cultures	الزراعة المستمرة والمستقرة
Cell Culture	زراعه الخلايا، مزرعة خلوية
Xenotransplantation	زرع اعضاء من جنس مختلف أو زينوترانسبلانتايشن
Human serum albumin	زلال المصل البشري
Scale-up	زيادة الإنتاج
Zithromax	زيثروماكس
Xylan	الزيلان
Xylanase	الزيلاناز
Essential oils	الزيوت العطرية الأساسية
Molasses	السائل السكري
AIDS- associated Kaposi sarcoma	سارومي كابوسي المترافقة لمتلازمة نقص المناعة المكتسبة
Salicylate	ساليسيلات
Subtilisin	السبتيليزين
Streptogramins	الستريبتوغرامينات
Citrate	ستريت

Sterol	ستيرول
Steroids	الستيرويدات
Pipetting	سحب أحجام محددة، تسحيح
Colorectal cancer	سرطان القولون والمستقيم
Growth rate	سرعة أو معدل النمو
Biomass specific conversion rate of compound i	سرعة التحويل النوعي في الكتلة الحيوية للمركب i
Specific conversion rate of compound i	سرعة التحويل النوعي للمركب i
Tangential Flow	سريان أو تدفق عرضي
Inert	سطح خامل أو جامد
Glycan	سكر معقد - غلايكان
Glycosylation	السَّكرلة، ربط السكريات بالبروتين، إضافة الغلايكوزيل
Sucrose	السكروز
SH-sugars	السكريات المرتبطة بمجموعة الثايول
Polysaccharides	السكريات المركبة المعقدة
Succinate	سكسينات
Succinyl-coA	سكسينيل كو A
Side chains	السلاسل الجانبية
Oligonucleotide	سلاسل نيوكليوتايد قصيرة أوليغونيوكليوتيد، قليلات النيوكليوتيدات
Strains	سلالات
Gram-negative	سلبية الغرام
Sequencing	سَلسَلة
Protein sequencing	سَلسَلة البروتينات
Heavy chain	السلسلة الثقيلة
Light chain	السلسلة الخفيفة
Nucleotide sequence	السلسلة النيكليوتيدية
Automated sequencing	سلسلة مُؤتمتة
Electron transport chain	سلسلة نقل الإلكترون

Respiratory chain	سلسلة نقل الإلكترون (سلسلة التنفس)
J-chain (joining chain)	سلسلة- J (سلسلة الانضمام)
Alkyl chain	سلسله ألكيل
H_2S	سلفور الهيدروجين
Sulphonamides	السلفون أميدات
Sulphite	سلفيت
Salmonella	سلمونيلا
Immunotoxins.	السموم المناعية
Toxicity	السُمِّية
Human body fluids	سوائل جسم الانسان
Pseudoplastic fluids	سوائل زائفة المطاوعة
Super-critical fluids	السوائل فوق الحرجة
Excipients	السواغات
Sorbitol	سوربتول
Somatotropin	السوماتوتروبين
Cytoplasm	السيتوبلازم
Cytosine	سيتوززين
Sitosterol	سيتوستيرول
Serine	سيرين
Sesquiterpenes	السيسكيتيربنات
Sigmoidal	سيغمويدي
Sepharose	السيفاروز
Cephalosporin	سيفالوسبورين
Caphalosporin C	سيفالوسبورين C
Cephalosporium	سيفالوسبوريوم
Cephem	سيفيم
Cellobiohydrolase	سيلوبيوهيدروليز
Silicates	سيليكات
Silicon	سيليكون
Profile	سيماء، مظهر

Tryptophan synthetase	سينثاتاز التريبتوفان
Synthons	السينثونات
Thiosulphate ion	شاردة ثايوسلفات
Control	شاهد
Endoplasmic reticulum	الشبكة الاندوبلازمية
Semi-synthetic	شبه أو نصف تصنيعي
Isocitrate	شبية الستريت
Fatty acyl triester glycerol	شحوم كليسيرول ثلاثي الإستر
Fv fragments	شدف Fv
Fragments	شدف، أجزاء، شظايا
ScFv (single chain Fv fragment)	شدفة Fv المنفردة السلسلة
Antigen -binding fragment/Fab	شدفة الربط بالمستضد/ شدفة Fab
Crystallisable fragment (Fc)	الشدفة المتبلورة (شدفة Fc)
Proteolytic fragment	شدفة ناتجة جراء التحلل البروتيني
DNA fragment	شدفة DNA، قطعة DNA، جزء DNA
Corn steep liquor	شراب الذرة الحاد
Liquor	شراب كحولي
Avidity	الشَرَه
Laboratory containment conditions	شروط احتواء مخبرية
Mild conditions	شروط/ ظروف معتدلة
Replication fork	شعبة للمُضاعفة
Malted barely	شعير منقوع
F pilus	شعيرات على السطح
Redundant codons	شفرات مكررة
Codon	شفرة - كودون
Start codon	شفرة البداية
Stop codon	شفرة التوقف
Genetic code	الشفرة الوراثية
Translation start codon	شفرة بدء الترجمة
Morphology	شكل (مورفولوجيا)

Topology	الشكل الطوبولوجي
α-helix	شكل لولب
Chitosan	الشيتوسان أو الكيتوسان
Fluorescent dye	صبغة أو ألوان مضيئة فلورسية
Chromosome	صبغي - كروموسوم
Osmotic shock	الصدمة التناضحية
β-sheets	صفائح- β
Phenotype	الصفات الشكلية الخارجية النمط الظاهري
Non-segregated	صفات متطابقة أي غير مقسمة إلى مجموعات
Platelets	صفيحات الدم
Viral plaque	صفيحة فيروسية
Microtiter plate	صفيحة مايكروتيتر
Pharmaceutical industry	الصناعة الدوائية
CT-box	صندوق CT
TATA box	صندوق تاتا
MHC class I and class II	الصنف I والصنف II من مركبات التوافق النسيجي الرئيسية
Sub-class	الصنف الفرعي
Ploidy	صيغة صبغية
Selective pressure	ضغط الانتقاء
Osmotic pressure	ضغط النَّضح
Back pressure	ضغط رجعي
Eugenics	الضغوط لتحسين النسل
Scattered light	الضوء المتشتت
Narrow spectrum	ضيق الطيف
Robotic printer	طابعة آلية
Standard enthalpy of formation	طاقة التكوين الداخلية (إنثالبي) المعيارية
Enthalpy	الطاقة الداخلية - إنثالبي
Standard Gibbs energy of formation	طاقة جبس المعيارية للتكوين
Reducing power	طاقة مُختزِلة

Regenerative medicine	الطب التجديدي
Biomedicine	الطب الحيوي
Lytic nature	الطبيعة الحالة
Microalgae	الطحالب المجهرية
Centrifugation	الطرد المركزي، النبذ المركزي
N-terminus	الطرف النتروجيني
Natural Gene Transfer	طرق نقل طبيعية للمورث أو الجين
Operation of bioprocess	طريقة تشغيل العملية الحيوية
Insertion mutation	طفرات إقحامية
Single-site mutations	الطفرات الموضعية
Oligonucleotide-directed mutagenesis	طفرات موجهة لموقع باستعمال أوليغونيوكليوتايد
Auxotrophic mutant	طفرة (طافر) عونية أو مخلطة التغذية
Diagnostics	طواقم، كواشف، وسائل تشخيصية
Lytic phase	الطور الانحلالي
Exponential phase	الطور التصاعدي أو الأسي
Lag phase	طور الراحة
Dormant phase (G_0 phase)	طور السبات
Stationary phase	طور السكون
G1 phase	طور تصنيع البروتين-الطور التحضيري
Attapulgite clays	طين الأتابولجيت
Interfacial phenomenon	ظاهرة تكوّن السطح البيني
Steric hindrance	العائق الفراغي
T-phages	العاثية T
Prophage	عاثية أولية أو بروفايج
Template	عارضة، قالب
Granulocytes- colony stimulating factor	العامل المحفز لتشكل مستعمرات الكريات البيض الحببية
Insulin-like growth factor-I	عامل النمو 1 الشبيه بالأنسولين
Blood clotting agent	عامل تخثرالدم

pH-controlling agent	عامل ضبط الرقم الهيدرجيني
Oxidant, oxidizing	عامل مؤكسِد
Reducing	عامل مُختزِل
Co-factor	عامل مساعد
Anti hemophilic factor	عامل مضاد الناعور
Transcription factor	عامل نسخ
Epidermal growth factor	عامل نمو البشرة
Double cross-over	عبور أو تصالب ثنائي أي مزدوج
Pulp	عجينة الورق/ اللباب
Inhomogeneity	عدم تجانس
Infection	عدوى
Polysaccharides	عديدات السكاريد، السكريات المركبة المعقدة
Polyketides	عديدات الكيتايدات، بوليكيتايد
polyhydrosis	عديدات الهيدروسيس
Polypeptide	عديدة البيبتيد
Mutant isolation	عزل الطافرات
Isolates	عزلات
Syrups	عصائر
Cytosole	العصارة الخلوية، السيتوزول
Turbulance	العصف
Bacillus	عصيات
Micro organ	عُضيات أو أعضاء صغيرة
Observed yield	العطاء الملاحظ
Yield	عطاء، محصول
Aromatic	عطري
Beads on a string	عقد حبيبات على خيط
Streptococcus pneumoniae	العقدية الرئوية
Streptococcus pyogenes	العقدية المقيحة
Gene therapy	العلاج الجيني
Germ-line gene therapy	علاج الجيني على الخلايا التكاثرية بمراحل نمو أولية

Phylogenetic relation-ships	العلاقات العرقية
Algebraic relations to calculate Stoichiometry	العلاقة الجبرية في حساب نسب العناصر - ستوكيومتري
Linear relation	علاقة خطية
Capsule	علبة، كبسولة
Molecular biology	علم الأحياء الجزيئية
Microbiology	علم الأحياء المجهرية
Systems biology	علم الانظمة البيولوجية
Genetics	علم الوراثة
Crystallography	علم بلوريات
Small scale	على نطاق مصغر
Generation time	عمر الجيل
Energy currency	العُملة النقدية للطاقة
Somatic re-arrangements of the genes	عمليات إعادة ترتيب جسدية للجينات
Metabolism	عمليات الأيض
Signaling	عمليات التأشير
Bioprocessing	العمليات التسلسلية الحيوية
Microbial process	العمليات الحيوية الجرثومية
Downstream processing	العمليات المتسلسلة المتعاقبة باتجاه المصب
Anabolic processes	عمليات بناء وتركيب
Polyadenylation	عملية الأدنلة المتعددة
Oxphos	عملية الأكسدة والفسفرة
Crystallization	عملية التبلور
Gelatinisation	عملية التحويل إلى هلام
Liquefaction	عملية التمييع
Cultivation	عملية الزرع
Passaging	عملية العبور
Splicing	عملية القطع والوصل
Methanogens	عملية المثننة
Maceration	عملية النقع، تعطين الكتان، تقطيع

Brewing	عملية إنتاج (الجعة) البيرة
Glcolysis	عملية تحلل السكر
Submerged fermentation process	عملية تخمير منغمرة
DNA repair mechanism	عملية تصليح للـ DNA
Reverse glycolysis	عملية تكسير السكر المعكوسة
Sparging	عملية ضخ الهواء
Denitrification	عملية طرد النايتروجين
Gluconeogenesis	عملية نشوء سكر جديد - غلوكونيوجنيسيس
Single Stereospecific hydroxylation	عملية واحدة من الهدرجة النوعية الفراغية
Column of Sepharose-Glutathione	عمود من السفروز الملصق عليه غلوتاثيون
Generic antibiotics	عموم المضادات الحيوية
Gene clusters	عناقيد (تجمع) الجينات
Muscat grape	العنب المسكي
Separation factor	عنصر التفريق
Infectious agents	عوامل معدية
Transposon	عوامل وراثية مُنتَقِلة - ترانسبوزون
Galactanases	غالاكتاناز
Adrenal gland	غدة الكظرأو الغدة الكظرية
Screen for	غربل، يبحث عن
Primary screening	غربلة أولية
Secondary screening	غربلة ثانوية
High-throughput screening	غربلة عالية الأداء
Griseofulvin	الغريسيوفولفين
Fibre wet-spinning	الغزل المرطب الليفي
Cell membrane	غشاء خلوي
Cytoplasic membrane	غشاء سيتوبلازمي
Semi-permeable membrane	غشاء شبه أو نصف منفذ
Hyphae	الغصينات
Aminoglycosides	الغلايكزيدات الأمينية

Glycoproteins	غلايكوبروتين - بروتينات سكرية - كاربوهيدرات معقد متحد مع البروتين
Glycosynthases	الغلايكوسينثاز
Glycohydrolase	غلايكوهيدرولاز
Glyoxylate	غلايوكزايلات
Glycerol	غلسيرول
Surface immunoglobulin	الغلوبولين المناعي السطحي
Membrane-bound surface immunoglobulin	غلوبولين مناعي سطحي مربوط بالغشاء
Immunoglobulin	غلوبولين مناعي، غلوبولين المناعة
Glutathione	غلوتاثيون
Glutathione-S-Transferase	غلوتاثيون- S -ترانسفرايز
Glutaraldehyde	غلوتارالديهايد
Glutaryl cephalosporins	غلوتاريل سيفالوسبورينات
Glutamine	غلوتامين
Glutamate	غلوتمايت
Glucans	غلوكان
Glucoamylase	الغلوكوأميلاز
Glucose 6-phosphaste	غلوكوز 6-فوسفات
G3P Glyceraldehyde 3-phosphate	غليسيرالديهايد 3- فوسفات
Non-covalent	غير تشاركية أو غير تساهمية
Undifferentiated	غير متمايزة
Non-limiting rate	غير مقيّد للسرعة (سرعة غير مقيدة)
Irreversible	غير المنعكس
Blunt	غير ناتئة
Blood group	فئة دم
Bacteriophage	فاج بكتيري أو عاثية
Vancomycin	فانكومايسين
Shelf-life	فترة صلاحية
Fructose 1,6-bisphosphatase	فركتوز1-6 بيسفوسفاتيز

Shoots	الفروع
Phosphorylation	الفسفرة
Physiology	الفسلجة، علم الوظائف
Fungi	فطر
Filamentous fungi	فطريات خيطية
Dermatophytes	الفطور الجلدية
Potency	فعالية
Carboligase activity	فعالية ربط بالكربون
Water activity	فعالية مائية
Aplastic anemia	فقر الدم اللا تنسّجي
Flavonoids	فلافونويدات
Flavin	فلافين
Transition metal	الفلز المتحول
Flouroquinolones	الفلوروكوينولونات
Phleomycin	فليومايسين
Phenylalanine	فنيل ألانين
Vinyl pyrrolidone	فنيل البايروليدون
Vinyl alcohols	فنيل الكحول
Formamide	فورمامايد
Formate	فورمايت
Formaldehyde	فورملديهايد
Pentose C_5 Phosphates	فوسفات السكر الخماسي أو بنتوز فوسفات
Tetrose C_4 Phosphate	فوسفات السكر الرباعي- تيتروز فوسفات
Phosphodiester	فوسفات ثنائي الإيستر
Phosphoenol pyruvate	فوسفواينول بايروفات
Phosphotyrosyl	فوسفوتايروسيل
Pi(Inorganic Phosphate)	فوسفور لاعضوي
In-frame	في إطار الترجمة الصحيح
In vitro	في الزجاج، في الأنبوب

Downstream	في موضع يتلو (تال لنقطة محددة) - في أسفل موقع
In situ	في موضعها الأصلي، في الموقع
Upstream	في موقع سابق
Phytoanticipins	الفيتوأنتيسيبينات
Virginamycine	الفيرجينامايسين
Hepatitis viruses	فيروس الالتهاب الكبدي
Respiratory syncytal virus	فيروس الإلتهابات التنفسية والدماغية
Vaccinia virus	فيروس الفاكسينيا
HIV	الفيروس المسبب لنقص المناعة المكتسبة
Bomyx mory virus	فيروس دودة الحرير
Sandia virus	الفيروس سانديا
Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV35S)	فيروس موزاييك القرنبيط
Multiple nuclear polyhyrosis virus	فيروس نووي متعدد عديدات الهيدروسيس
Arbo viuses	الفيروسات المنقولة بالمفصليات
Budding viruses	فيروسات متبرعمة
Legionella	الفيلقية
Time-lapse movie	فيلم مقتصر
Femtograms	فيمتوغرام
Phenanthrene	فينانثرين
Phenoxy acetic acid	فينوكسي حمض الخل
Substituted phenol	الفينول المستبدل
Phenylpropanoid	فينيل البروبانويد
Phenyl acetic acid	فينيل حمض الخل
Fumarate	فيومارايت
Fumarase	فيوماريز
European inventory of exiting commercial substances (EINECS)	قائمة جرد المواد التجارية المتوافرة الأوروبية
Replicative	قابل للمضاعفة
Saccharide acceptors	قابلات السكاريد

Feasibility	القابلية للتطبيق
Schiff base	قاعدة Schiff
Rule of thumb	قاعدة الإبهام
Matrix	قالب، مصفوفة
Toxic substances control act (TSCA)	قانون التحكم بالمواد السامة
Logistic law	قانون المنطق اللوجستي
Totipotency	القدرة على التشكيل
Extrusion	القذف
Proofreading	القراءة التصحيحية
Fraction	قسم، جزء أو شظية
Microprojectile bombardment	قصف بمقذوفات دقيقة
Functional domain	قطاع الفاعلية
Globular domain	القطاع الكروي
Domains	قطاعات
Transmembrane domains	قطاعات بروتينية داخل الغشاء
Electrode	قطب كهربائي
Diversity segment/D-segment	قطعة التنوع/ القطعة- D
J-segment	قطعة- J (قطعة الانضمام)
V-segment	القطعة- V
Fluidized bed	القعر المسيّل
Nucleocapsid	قفيصة منواة
Neutropenia	قلة العَدِلات
Oligosaccharides	قليلات السكاريد
Cellooligosaccharides	قليلات السكر السيلولوزية المترابطة بروابط بيتا- 4،1
Peak	قمة، ذروة
Roller bottles	قوارير جهاز البكرات (الدحرجة)
Data bases	قواعد البيانات
Genetic databases	قواعد المعلومات الوراثية
Nucleotide bases	قواعد نيوكليوتايدية

Substructure	قوام
Proton motive force (PMF)	قوة البروتون للتفعيل ، الجِبْلات المُجردة
Block/sheet moulding	قولبة بالبلوك أو بالصفيحة
Van der Waal forces	قوى van der Waal
Shear forces	قوى الجز
Amperometric	قياس الأمبيرية
Luminometry	القياس الضوئي - لومينومتري
Spectrometry	القياس الطيفي - سبكترومتري
Mass spcetrometry	قياس الكتلة الطيفي
Mass Spectrometry	قياس الكتلة الطيفي
Measuring yields	قياس المحصول
Simple photometric adsorbancy measurement	قياس بسيط ادمصاصي بواسطة مقياس ضوئي
Stoichiometry	قياس تناسب العناصر في التفاعل - ستوكيومتري
Mesophilic organisms	الكائنات الحية المحبّة للحرارة المعتدلة
Higher eukaryotes	الكائنات الراقية حقيقية النواة
Micobiota	الكائنات المجهرية الطبيعية الموجودة في الأمعاء أو في الوسط الحيوي
Extremophiles	الكائنات المحبة للظروف المتطرفة
Surrogate host microorganism	كائنات مجهرية مضيفة بديلة
GM microorganisms	كائنات مجهرية معدلة وراثياً
Geneticaly modified organisms	كائنات معدلة وراثياً
Repressor	كابت ، كابح ، حابس
Carbamate kinase	كاربامايت كاينيز
Carbovir	الكاربوفير
Carboxypeptidase A	الكاربوكسيبيبتيداز A
Hydrophobic	كاره للماء
Carotenoid	الكاروتينويد
Expression cassette	كاسيت التعبير
Cassetes	كاسيتات

Camphor	كافور
Chitin	كايتن أو الشيتين
Immunosuppress	الكبت المناعي
Myelosuppression	كبت النخاع
Ammonium sulphate	كبريت الأمونيوم
ZnS	كبريت الزنك
Cell capsule	كبسولة الخلية
Catalase	الكتالاز
Biomass	الكتلة الحيوية
Cell density	الكثافة الخلوية
Optical density	الكثافة الضوئية
Phenyl ethyl alcohol	كحول فينيل الايثيل
Carbapenems	الكربابينيمات
Carbohydrates	كربوهيدرات
Hydrophobcity	كره الماء (طرده)
Crotonase	كروتونيز
Affinity chromatography	كروماتوغرافيا الألفة أو التآلف
Gas chromatography (GC)	الكروماتوغرافيا الغازية
Chromatin	كروماتين
HPLC	الكروموتوغرافيا السائلة العالية الأداء، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي
Yeast artificial chromosomes (YAC)	كروموزوم الخميرة الاصطناعي
Bacterial artificial chromosomes = BAC	كروموسومات بكتيرية اصطناعية
Clarithromycin	كلاريثرومايسين
Clavams	الكلافامات
Chlorination	الكلورة
Chlorotetracyclin	الكلوروتيتراسايكلين
Gluconate	كلوكونيت
Human embryonic kidney	كلى مضغية بشرية

Molecular weight marker	كمؤشر للحجم الجزيئي
Kanamycin	كنامايسين
Reactive reagents	كواشف أو مواد ومركبات متفاعلة
Diagnostic agents	كواشف تشخيصية
Bifunctional reagents	كواشف ثنائية الوظيفة
Carrageenans	الكوراجينات
Cortisol	الكورتيزول
Cosmid Vector	كوزميد ناقل
Collagen	الكولاجين
Keratin	الكيراتين
Chiral	الكيرال، غير متناظر مرآتياً
Kilo base pair (kbs)	كيلو زوج قاعدي
Harsh chemicals	الكيماويات الجالفة/ القاسية
Fine chemicals	الكيماويات الدقيقة
Bleaching chemicals	كيماويات مبيضة
Chemotrypsin	كيموتريبسين
Immunocyto chemistry	الكيمياء الخلوية المناعية
Agrochemical	كيمياء الزراعة
Clinical chemistry	الكيمياء الطبية
Kinase	كيناز
Entities	كينونات
Immunoadhesins	اللاصقات المناعية
Lactate	لاكتات
Lactams	اللاكتامات
Lactose	لاكتوز
Acetyllactosamine	اللاكتوز الأميني
Lacton	لاكتون
Lanthionines	لانثيونين
Facultative anaerobe	لاهوائية اختيارية
Wood pulp	لباب الخشب

Immune system has checks and controls	لدى جهاز المناعة مراكز توقيف وضبط
Cell cytosmears	اللطخات الخلوية
Smear	لطخة
Diphtheria vaccine	لقاح الدفتيريا
Tetanus vaccine	لقاح الكزاز
Lyme disease vaccine	لقاح داء لايم
Retrovirus vaccine	لقاح فيروس العجلية
Cluster designation (CD)	لقب التجمع
D-amino-acids	للأحماض الأمينية ذات الوضعية D
Leukemia	لوكيميا
Hairy cell leukemia	لوكيميا مشعرّة الخلايا
Lipase	ليباز
Liposomes	الليبوزومات، كريات دهنية ليبوزومية
Lysozyme	ليزوزايم
Lignan	ليغنان
Lignin	ليغنين
Levofloacin	الليفوفلوسين
Fibrin	ليفين، فبرين
Lycopene	الليكوبين
Lymphocytes	الليمفاويات
B-lymphocytes	ليمفاويات بائية
Non-hodgkins lymphoma	ليمفوما لا هودجكينية
Indicator	مؤشر
Marker	مؤشر
Affinity tag	مؤشر أو علامة للتآلف
Molecular size markers	مؤشرات الطول الجزيئي
Biomarkers	مؤشرات حيوية
Limiting substrate	المادة الأولية المُحدِّدة
Substrate	المادة الأولية، مركب أولي، الركيزة

Primers	مادة بادئة، مهايئ
Denaturant	ماسخ
Recombinant	مأشوب
Macrolides	الماكروليدات
Malonate	مالونيت
Malate	ماليت
Mannases	ماناز
Mannans	مانان
Immune donor	مانح مناعة
Donors	مانحات
Mannosides	المانوزيدات
Mannitol	مانيتول
Mycelium	مايسيليوم
Mycoplasma genitalium	مايكوبلازما جينيتاليوم
Conservation principles	مبادئ المحافظة
Ion exchangers	مبادِلات أيونية
Spacers	مباعدات
Hyperglycosylation	المبالغة بالسَّكرلة أو بإضافة مجموعة الغلايكوزيل
Herbicide	مبيدات الأعشاب
Tandem	متتابعة متعاقبة
Homologous	متجانس
Overlapping	متداخلة
Chlamydial	المتدثرية
Cohesive	متراكبة قابلة للإلتصاق
Multi-meric	متعدد الأجزاء
Polyactide-polyglycolide	متعدد الأكتايد مع متعدد الغلايكولايد
Relapsing-rimitting (MS)	المتعدد اللوحي الناكسي المتراخي
Polyacetic acid	متعدد حمض الخل
Multi-phase	متعددة الأطوار
Heterogeneous	متغاير

Heterologous	متغايرأو مختلف الأصل، غريب
Reactants	متفاعلات
Autoreactive	المتفاعلة ذاتياً
Fluorogenic	متفلورة
Mitochondria	المتقدرات، الميتوكوندريا، السبحيات
Degenerate	متكرر
SARS	المتلازمة التنفسية الحادة
Complements	المتممات، التمائم أو التميمات
Reproducible	متناتج، متكاثر، قابل للتكاثر
Proportional	متناسب، تناسبي
Recessive	متنحي
Cytostatic	مثبت للخلايا
Osmotic stabilizer	مُثبِّت نضح
Stabilizers	مثبتات
Inhibitor	مثبط
Fungioststic agents	مثبطة لنمو الفطور
Allergens	مثيرات التحسس
Methyl	مثيل
Population	مجتمع، سكان، تجمع حيوي
Probes	مجسات، مسابر
Lyophilised	المجفدة
Culture collections	مجموعات الزرع
Linkage group	مجموعة ارتباط
Sulphydryl group	مجموعة الكبريت
Haemotopoetic growth factors	مجموعة عوامل نمو منشئات الدم
Bright field microscopy	مجهر الحقل المضيء
Light microscope	المجهر الضوئي
Confocal microscopy	مجهرية البؤر المتحدة
Simulation	محاكاة
Hyper-thermophilic	مُحب لدرجات الحرارة المرتفعة جداً

Hydrophilic	مُحب للماء
Thermophiles	المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة
Psychrophilic	المحبة لدرجات الحرارة المنخفضة أو للبرودة
Halophiles	المحبة للأملاح
Piezophiles	المحبة للعيش تحت ضغط مرتفع
Acidophiles	المحبة للعيش في أوساط حامضية
Alkaliphiles	المحبة للعيش في أوساط قلوية
Elicitor	محرّض، محفز
Biotic elicitor	محرضات حيوية
Abiotic elicitor	محرضات لا حيوية
Inducible promoter	محرك قابل للتحفيز - مُحرك قوي يمكن تحفيزه
Yield of biomass x on compound i	محصول الكتلة الحيوية x على المُركَّب i
Promoter	مُحِضّ، مُشجع
Positive effector	مُحَفِّز إيجابي
Conserved	محفوظة
Deletion	محو
Transgenic	محوَّر
Periplasmic space	المحيط البلازمي المجاور
Transcriptional reporter	مخبر نسخي
Outlet	مخرج
Working stock culture	مخزون المزارع التي ستستخدم في الإنتاج
Flow diagram	مخطط انسيابي
Surfactant	مخفضات الشد أو التوتر السطحي
Lubricants	المخففة للاحتكاك
Chelators	مخلبيات كيميائية
Plant wastes	مخلفات النباتات
Bioremediation	المداواة الحيوية
Inlet medium	المدخل
Inserts	مدرجات، مدغمات
Complexity	مدى تعقيد

Non-aqueous solvents	مذيب غير مائي
Micelles	مُذيَّلات
N-linked	مرتبط بالنيتروجين N
Tropophase	مرحلة التغيُّر، متعددة الأطوار
Morphogenesis	مرحلة تغيير في الشكل
Idiophase	مرحلة نمو تتميز بالسكون
Rotary vaccum filter	مرشح دوار في الفراغ
Boving spongiform encephalopathy	المرض الدماغي الإسفنجي عند الأبقار
Haemolytic disease of the newborn (HDN)	مرض تحلل خلايا الدم الحمراء لدى حديثي الولادة
Creutzfeldt–Jakob disease	مرض جاكوب الكروتسفيلدت
Coronary angioplasty	مرض رأب الوعاء التاجي
Broth	مرق
Immune complex	مركب (معقد) المناعة
Analyte	المركب المُحَلَّل
Transcriptional complex	مركب أو مجمع نسخي
Unprotonated compound	المركب بالشكل المُزال منه البروتون
Intermediate compound	مركب وسيط، متوسط
Glucocarticoids	المركبات القشرانية السكرية
Reference compounds	مركبات المُعتمدة كمرجع
Procursor metabolites	مركبات أيض أو مستقلبات سالفة
Diazo	مركبات داي آزو
Precursors	مركبات سالفة
Multi-enzyme complexes	مركبات متعددة الأنزيمات
Metabolites	مركبات ومنتجات الأيض
Center for drug evaluation and research (CDER)	مركز الأبحاث وتقيم الأدوية
Tufits	مركز تافتس
Origin (of x, y-axis)	المركز، الأصل (نقطة المركز أو الأصل)
Plant tissue culture	مزارع الأنسجة النباتية

Perfusion cultures	مزارع التنقيط
Suspension cultures	مزارع معلقة
Explant	المزدرع
Double stranded	مزدوجة الجديلة
Batch culture	مزرعة الدفعة
Fed-batch culture	مزرعة الدفعة المغذاة
Continuous culture	المزرعة المستمرة
Master frozen culture	مزرعة مجمدة رئيسة
Submerged culture	مزرعة مغمورة
Oxygenated	مزود بالأوكسيجين
Labeled DNA or RNA probes	مسابر موسومة من DNA الـ أو الـ RNA
Cross-sectional area of the downcomer	مساحة المقطع العرضي للنازل
Free flowing powders	مساحيق طليقة
Ribosomal synthetic pathway	مسار تصنيع ريبوزومي
Non-ribosomal synthetic pathway	مسار تصنيع غير ريبوزومي
Glyoxylate bypass	مسار غلايوكزيلات البديل
Pentose phosphate pathway	مسار فسفات السكر الخماسي
Catabolic Pathways	مسارات الأيض الهدمي (التكسير)
Transduction pathway	مسارات انتقال الإشارات
porous	مسامي
DNA probe	مسبار أو مجس الـ DNA
Labelled probe	مسبار موسوم
Effectors of the immune system	مستجيبات للجهاز المناعي
Biopharmaceuticals	المستحضرات الدوائية الحيوية
Crude leprations	مستحضرات غير متقنة الصنع
Emulsion	مستحلَب
Haemophilus	المستديمة النزلية
Antigen	مستضد
Tumour-associated antigen	المستضد المترافق للورم

Colonies	مستعمرات
Receptor	مستقبل
Fc receptor	مستقبل الشدفة المتبلورة، مستقبل شدفة Fc
Secondary metabolites	المستقلبات الثانوية
Denaturation	مسخ أو تفكك البنية أو الهيكل - فصل الجدلتين عن بعضهما البعض
Solid support	مسند أو داعم صلب
Differential Controller proportional integral	المسيطر التفاضلي التكاملي المتناسب
Human Genome Project	مشروع الجينوم البشري
Teratogenic	مُشوِّه
Enantiomer	مصاوغة مرآتية
Array	مصفوفة
Microarray	مصفوفة مجهرية
Serum	مصل الدم، مصل
Antiarythmic	مضاد اضطرابات النظم
Anti thrombin III	مضاد التجلط III
Alpha1-anti trypsin	مضاد التريبسين-ألفا 1
Anticholinergic	مضاد الفعل الكولينيي
Antibiotics	المضادات الحيوية
Parent antibiotics	المضادات الحيوية الأصل
Food additives	المضافات الغذائية
Organic supplements	مضافات عضوية
Fluorescent	مضيئة فلوريسية
Host	المضيف، العائل
Aspects	مظاهر
Regulatory and safety aspects	المظاهر الرقابية والأمانية
Linear rate equations	معادلات النسب الخطية
Rate equations	معادلات النسبة
Differential equation	معادلة تفاضلية

First-order differential equation	معادلة تفاضلية من الدرجة الأولى
Third-degree polynomial equation	معادلة متعددة الحدود من الدرجة الثالثة
Post recovery processing	معالجات ما بعد الاسترجاع
Grid and parallel processing	المعالجة المتوازية والشبكية
Mash treatment	معالجة الهريس
Coefficient	مُعامِل
Molar absorption coefficient	معامل الامتصاص المولي
Jacket side fouling film heat transfer coefficient	معامل الانتقال الحراري للغشاء المترسب على جانب الغلاف
Maintenance coefficient	مُعامل الصيانة
Mass transfer coefficient	مُعامل انتقال الكتلة
Biorefiners	معامل تكرير حيوي
Substrate maintenance coefficient	مُعامِل صيانة المادة الأولية
Maintenance coefficient of compound i	مُعامل صيانة المُركَّب i
Yield coefficient of biomass per substrate, incl. maintenance	مُعامل عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية، مُتضمّناً عطاء البقاء
Stoichiometric coefficient	مُعامل قياس رياضي أو مُعامل ستوكيومتري
Radioimmunoassays	المعايرات المناعية المشعة
ELISA	المعايرات المناعية الممتزة المتصلة بالأنزيم
Immunometric assays	معايرات قياس مناعية
Assay	معايرة
Kinetic assay	معايرة حركية
Cytochemical assay	معايرة كيميائية خلوية
Parameters	المعايير
Generally recognized as safe (GRAS)	معترف بأمانها بشكل عام
Calf stomach	معدة العجل
Specific substrate uptake rate	معدل الامتصاص النوعي للمادة الأولية
Dilution rate	معدل التخفيف
Critical dilution rate	معدل التخفيف الحرج

On-rate	معدل التشغيل
Volumetric formation rate	معدل التكوُّن الحجمي
Flow rate	معدل الجريان
Outlet medium flow rate	معدل الجريان في المخرج
Inlet flow rate	معدل الجريان في المدخل
Volumetric rate	المعدل الحجمي
Off-rate	معدل الفصل
Linear growth rate	معدل النمو الخطي
Specific growth rate	معدل النمو النوعي
Temperature correction	مُعَدِّل أو مُصحِّح الحرارة
Net formation rate	معدل أو مقدار التكوين الصافي
Electron donor	معطي الإلكترون
Antisense	معكوس الاتجاه
Suspension	معلق
Cell suspension	معلق خلايا
Free suspensions	المعلقات الحرة
Real-time information	معلومات وقت حصولها
Bioinformatics	المعلوماتية الحيوية
Parameter	معيار
Micronutrients	المغذيات الدقيقة
Macronutreints	المغذيات الكبيرة
Encapsulated	مغلف، محاط بتغليفات
Plug flow reactor (PFR)	مفاعل الانسياب المُقنَّن (المضبوط بالسدادة)
Continuous stirred tank reactor (CSTR)	مفاعل الحوض المخفوق المستمر
Batch stirred tank reactor (BSTR)	مفاعل الحوض المخفوق بالدفعة
Bioreactor	المفاعل الحيوي
Basket reactor	مفاعل السلة
Membrane reactor	مفاعل الغشاء
Hollow fibre reactor	مفاعل ليفي مجوَّف

Stirred tank reactor	مفاعلات (ذات أحواض) مزودة بخلاطات
Photo-bioreactors	المفاعلات الحيوية الضوئية
Batch reactors	مفاعلات الدفعة
Packed bed reactors	مفاعلات القعر المرصوص
Air lift bioreactor	مفاعلات حيوية ذات مصاعد هوائية
Unbaffled stirred bioreactor	مفاعلات حيوية مزودة بخلاطات منظِّمة للانسياب
Phosphorylated	المفسفَر
Mycoplasmals	المفطورات
Activator	مفعّل
Tissue plasminogen activator(tPA)	مفعّل البلازمينوجين النسيجي
Plasminogen activator mutein	مفعّلات بلازمينوجين ميوتيني (مُطْفَر)
Kinetic expressions	المقادير الجبرية الحركية
Retro-biosynthetic approach	مقاربة التصنيع الحيوي التراجعي
Scale down approach	مقاربة تخفيض الإنتاج
Approach	مقاربة، توجه
Antibiotic resistance	مقاومة المضادات الحيوية
Standards and controls	المقاييس والضوابط (الشواهد)
Biolistics	مقذوفات حيوية
Entrainers	المُقِلات أو الساحبات
Cardiotonic	مقوٍ للقلب
Spectrophotometer	مقياس الطيف، المطياف الضوئي
Micro scale	مقياس دقيق
Standard	المقياس، قياسي، معياري
Rate limiting	مقيِّد السرعة
Conservation constraints	مقيِّدات مبدأ المحافظة
Partition coefficient	مكافئ التفرق
DNA libraries	مكتبات الـ DNA
Genomic and Gene libraries	مكتبات الجينوم ومكتبات الجين
Combinatorial libraries	مكتبات اندماجية
Genomic libraries	مكتبات جينية

Phage display libraries	مكتبات عرض العاثيات
Gene library	المكتبة الجينية
Streptococci	المكورات العنقودية
Enterococcus	المكورة المعوية
Mis-folded	ملتف بصورة خاطئة
Pollinators	الملقحات في غبار الطلع
Polluters	ملوثات
Good manifacturing practice	الممارسة التصنيعة الجيدة
Adsorbed	ممتز ، مدمص
Endothermic	مُتصَّة للحرارة أو مُستهلِكةٌ للطاقة
First order	من الدرجة الأولى (متناسب بشكلٍ مباشر)
Framework regions	مناطق الهيكل
Complementary determining regions CDR (1, 2 and 3)	مناطق تحديد التكامل
Autoimmune	المناعة الذاتية
Passive immunity	المناعة السلبية
Immunochemical	المناعة الكيميائية
Transductant	المُنبَّغ
Tryptic product	منتجات افتراضية لقطع نظري بواسطة تريبسن
Pooled blood products	منتجات الدم المجمعة
By product	منتجات ثانوية ، فضلات
Growth connected products	منتجات متصلة بالنمو
energy yielding	مُنتِجة ومحررة للطاقة
Nucleophilic	منح للإلكترون
Curve	منحنى
Primary transcript	منسوخات أولية
Tonic	منشط
V-region (variable region)	المنطقة- V (المنطقة المتغيرة)
Detergent	منظف
Negative selection System	منظومة الاختيار السلبي

Yeast two-hybrid system	منظومة التهجين الثنائي في الخمائر
Yeast one-hybrid system	منظومة التهجين المنفرد للخميرة
Reversible	منعكس
Rennet	مِنفَحة
Knock-out	منقوصة جين محدد
Terminator	منهّي
Biocompatablity	موائمة حيوية
Feedstock	المواد الأولية أو المخزون
Reagents	مواد التفاعل، الكواشف
Non-ionic detergent	مواد التنظيف الغير أيونية
Toxin	مواد سامة
Carbon Intermediates	مواد كربون أولية وسيطة
Metal chelate chromatography material	مواد كروماتوغرافيا خُلابية معدنية
Oxidalive stress	مواد مؤكسِدة
Reductant	مواد مُختزِلة
Adjuvants	مواد مساعدة، مساعدات
intermediate precursors	مواد وسيطة وجزيئات سالفة
Multiple clonning site (MCS)	مواقع الانتساخ المتعددة
Multiple antigen-binding sites	مواقع الربط بالمستضد المتعددة
Replication origins	مواقع أو نقاط بدء التضاعف
Programmed cell death	الموت الخلوي المبرمج
Ultrasonic	موجات فوق صوتية
Marker gene	مورث أو جين مؤشر
Vector-based antibiotic resitance gene	مورث مقاومة المضادات الحيوية الموجود في الناقل
Protein-encoding genes	مورثات أو جينات تحمل شفرة البروتينات
Inherently	موروث
Mediator	موسّط
Radiolabelled	موسوم بمشع
Labeled	موسوم، مُعلَّم

Ribosome binding site	موضع اتصال (ارتباط) الريبوزوم
Repressor binding site = operator	موقع ارتباط المُثبِّط
Activator binding site	موقع ارتباط المُنشِّط
Active site	الموقع الفعال
Origin of replication	موقع بدء التضاعف
Transcription initiation site	موقع بدء النسخ
Restriction site	موقع حصري
Ectopic	موقع غير محدد
Origin of transfer = OriT	موقع للانتقال
Transcription terminator	مُوقِفُ (إشارة وقف) عملية النسخ - إشارة إنهاء النسخ
Monoxygenase	المونوأوكسيجيناز
Monobactams	المونوبكتامات
Monomers	مونوميرات (مكاثير احادية)
Metabolome	ميتابولوم
Methanol	ميثانول
Methicillin	الميثيسيلين
Methyl ester	ميثيل الاستر
Methyl tertiary butyl ether	ميثيل ثلاثي البيوتيل الاثيري
Mechanistic	الميكانيستية
Myxococcus xanthus	ميكسوكوكس زانثص
Muteins	ميوتينات وهو بروتين مطفر بواسطة التقانة الحيوية
Naproxen	نابروكسين
Products	الناتجات، نواتج التفاعل
Dehydrgenase	نازعة الهيدروجين (ديهادروجيناز)
Downcomer	النازل
Reverse transcriptase	الناسخ العكسي
Ripened	ناضج، معتق
Naphthalene	النافثالين

Vector	ناقل
Expression vector	ناقل تعبيري
Shuttle vector	ناقل مكوكي
Glycosyltransferases	ناقلات الغلايكوزيل
Nitrate	النايترات
Nitrilo triacetic acid-NTA	نايترلو ثلاثي حمض الخل
Nitrocellulose	نايتروسللوز
Nitrite	النايرايت
Nylon	نايلون
Lump	نُدبة
Enzymetic deamination	نزع مجموعة الأمين أنزيمياً
Molar ratio	النسبة المولية
Rate	نسبة أو سرعة أو معدل
Transcription	النسخ
Reverse transcription	النسخ العكسي
Connective tissue	النسيج الضام
Clones	نسيلات، كلونات
Catalytic acitivity	نشاط التسريع أو التحفيز
Radioactivity	النشاط أو الفعالية المشعة
Semi-batch	نصف الدفعات
Half-life	نصف العمر
Range	نطاق، مدى، مجال
Mismatch repair system	نظام إصلاح الجدلات غير المتكاملة في الـ DNA
Experimental system	النظام التجريبي
Detection system	نظام الكشف
Transport systems	نظام النقل
Active transport system	نظام النقل الفعال
Electron transport-coupled phosphorylation System = ETP	نظام انتقال الإلكترون المرافق للفسفرة
Reversed electron transport	نظام نقل الإلكترون عكسياً

Denitrifying growth system	نظام نمو طارد للنيتروجين
Lipid bilayer systems	نظم دهون ثنائية الطبقة
Liquid inlet jets	نفاثات دخول السائل
Permeable	نفوذة، قابلة للتناضح
Purity	نقاء
Inflection point	نقطة الالتواء
Origin ori	نقطة بدء المضاعفة
Transcriptional start point = tsp	نقطة بداية النسخ
Isoelectric point	نقطة تَسَاوي الشحنات
Impregnation of a porous support	نقع الداعم المسامي
Gene transfer	نقل الجينات
Direct gene transfer by particle bombardment	نقل الجينات مباشرة بواسطة قصف الجسيم
Tansglycosidation	نقل الغلايكوزيل
Vesicular transporter	نقل بالحويصلات
Mismatched blood transfusion	نقل دم غير موائم
Facilitated transport	نقل مُسهَّل
active transport	نقل ناشط - نقل فعال
Wort	نقيع
Black box models	نماذج الصندوق الأسود
Mathematical models	نماذج حسابية
Kinetic modeling of Cell Growth	نَمذَجَة حركية لنموّ الخلايا
Gene expression patterns	نمط التعبير الجيني
banding pattern	نمط الشرائط
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)	نمط الشرائط الناتج عن عملية هضم أو قطع الـ DNA بالأنزيمات الحصرية
Transcriptional profile	النمط النسخي
Continuous culture	نمط تغذية مستمرة
Balanced growth = Tropophase	النمو المتوازن - تروبوفيس
Diauxic growth	نمو باستهلاك مصدرين

Vegetative	نمو نباتي
Model	نموذج
Unstructured model	النموذج غير البنيوي
Sub-type	نُمَيْط
Secretion vectors	نواقل الإفراز
Transformation vectors	نواقل التحويل
Integration Vectors	نواقل اندماج
Phagemid vectors	نواقل فاجمايد
Shuttle or bifunctional vectors	نواقل مكوكية أو ثنائية الوظيفة
Species	نوع
Wild type	نوع بري طبيعي
Verbal	نوعي لفظي
Specific	نوعي، خاص، محدد
specificity	نوعية (تخصص/ انتقائية)
Niacinamide	نياسيناميد
Nitralase	النيترلاز
Nitrosoguanidine	نيتروزوغوانيدين
Acetonitril	نيتريل الخل
Neisseria meningetidis	النيسرية السحائية
Nisin	نيسين
Nickel	نيكل
Nicotinamide	نيكوتين أميد
Nicotinamide adenine dinucleotide	نيكوتينأميد أدنين ثنائي النيوكليوتايد
Newtonian	نيوتوني
Neurosporene	نيوروسبورين
Nuclease	نيوكلياز
NADPH	النيوكليوتايد الاميني الأديـنيني الثنائي النيوكليوتايد الحامل للهيدروجين
Deoxynucleotide triphosphates	نيوكليوتايد الثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسيجين

Nucleotide	نيوكليوتيد
Nucleosides	النيوكليوزايدات
Nucleosomes	نيوكليوسوم
Nucleoid	نيوكليويد
Neomycin	نيومايسين
Hapten	هابتن
Catabolite	الهادم
Aliphatic hydroxyl carboxylic acid	هايدروكسي حمض الكربوكسيل المفتوحة
Hydroxymuconic semi aldehyde	هايدروكسي ميوكونك شبيه الألديهايد
Hygromycin	هايكرومايسين
Electrophoresis	الهجرة الكهربائية، الرحلان الكهربائي
F1 hybrid	هجين الجيل الأول
Chimaeric, chimeric	هجينة كيمرة أو خيميرية
Human growth hormone	هرمون النمو البشري
Histidine	هستيدين
Ionotropic gel	هلام الأيونوتروبيك
Silica	هلام السيليكا
Hydrogel	هلام مائي
agarose gel	هلام من الأغاروز
Halogenations	هلجنة
Metabolic engineering	الهندسة الأيضية
Engineering genes	هندسة الجينات
Genetic Engineering	الهندسة الوراثية
Pathways engineering	هندسة مسارات التفاعل
Aerobic	هوائي
Follicle stimulatory hormone	الهورمون المحفز للجريب
Hornblend	الهورنبلند
Genotype/Genotypic	هوية جينية - نمط جيني أو وراثي
Linearised	هيئته الخطية
Hydrodynamic	الهيدروديناميكي

Hydostatic	الهيدروستاتي (توازن المائع)
Hydrofoil	الهيدروفويل
Hydrocarbons	هيدروكربون أو كربون مهدرج
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	هيدروكربون عطري متعدد الحلقات
Hydroxyl	الهيدروكسيل
Hydrolase	هيدرولاز
Histones	هيستونات
Hexadecane	هيكزاديكان
Hexokinase	هيكسوكاينيز
Broad spectrum	واسع الطيف
Selection marker	واسم انتقاء
Bacterial selection marker	واسم لانتقاء البكتيريا
Pilot- plant	وحدات تصنيع تجريبية
Transcriptional units	وحدات نسخ
Plaque forming unit	وحدة تشكل اللويحة
Single valency	وحيد التكافؤ
Molecular genetics	الوراثة الجزيئية
Chronic granulomatous disease (CGD)	الورم الحُبَيْبِي المزمن
Pituitary tumour	ورم الغدة النخامية
Dry weight	وزن جاف
Biosensors	وسائل وأدوات تحسس حيوية
Free medium	الوسط الحر (الخالي من الخلايا)
Spent medium	الوسط المستنفذ
Fresh medium	وسط نقي
DNA Labeling	وسم الـ DNA
Intermediate	وسيط
Pro-inflammatory mediator	وسيط بادئ الالتهاب
Blotting	وصم
Southern blotting	وصمة ساوثرن

Effector functions	وظائف المستجيب
Immune functions	وظائف المناعة
Structural function	وظيفة هيكلية أو بنيوية
Functional	وظيفي، فعال، فاعل
Residence time	وقت البقاء
Doubling time	وقت التضاعف
European agency for the evaluation of medical products (EMEA)	الوكالة الأوروبية لتقييم المنتجات الطبية
Food Standard Agency	وكالة معايرة الغذاء
Decoded	يُترجَم
Infused	يتسرب
Exothermic	يُحرر حرارة
Catalyze	يحفز أو يسرِّع
Cytokinins	اليستوكينينات
Encoding	يُشفر
Induce	يطلق، يحفز، يتسبب
Saprophytic	يعيش على المادة الميتة أو العفنة
Rate-limiting step	يقوم بتحديد أو إبطاء سرعة التفاعلات التالية
Restricting	يقيد، يحصُر، يحجز
Uracil	يوراسيل
Urea	يوريا
Urease	اليورياز
Uridine	يوريدين

ثبت المصطلحات
إنجليزي ـــ عربي

6-Hydroxynicotinic acid	6-هيدروكسي حمض النيكوتين
7-aminocephalosporinic acid	7-أمينوحمض السيفالوسبورينيك
7-aminodesacetoxy cephalosporic acid	7-أمينو حمض ديساسيتوكسي سيفالوسبوريك
Abacavir	الأباكافير
Abiotic elicitor	محرضات لا حيوية
Absorbance	الامتصاص الضوئي
Accumulation	تراكم
Acetaldehyde	أسيتالديهايد
Acetamidase	أنزيم أسيتاميديز
Acetamide	أسيتامايد
Acetate	أستات
Acetate kinase	أنزيم فسفرة أسيتايت
Acetic acid	حمض الخل
Acetoine	أسيتوين
Acetone	أسيتون
Acetonitril	نيتريل الخل
Acetyl coenzyme A	أستيل كو-انزيم A
Acetyl kinase	أنزيم فسفرة الأسيتيل
Acetyllactosamine	اللاكتوز الأميني
Acid genes	جينات تعمل في وسط حمضي
Acidophiles	المحبة للعيش في أوساط حامضية

Aconitase	أكونِتيز
Acrylamide	أكريلمايد
Acrylates	الأكريلات
Activated, CD4-positive, T-helper cells	الخلايا التائية CD4+ المساعِدة المفعَّلة
Activator	مفعّل
Activator binding site	موقع ارتباط المُنشِّط
Active site	الموقع الفعال
active transport	نقل ناشط - نقل فعال
Active transport system	نظام النقل الفعال
Acylating enzymes	أنزيمات الأسْيلة
acylion condensation	التكثف لإستر الكربوكسيليك
Adaptive proteins	بروتينات تكيفية
Adenine	أدنين
Adenosine diphosphate	أدينوسين ثنائي الفوسفات
Adenosine monophosphate	أدينوسين أحادي الفوسفات
Adenvirus	الحمى الغدية
Adenylate cyclase	أنزيم تحلُّق الأدينيلايت أو أدنيليت سايكليز
Adiponitrile	أديبونايترايل
Adjuvants	مواد مساعدة، مساعدات
Adrenal gland	غدة الكظر أو الغدة الكظرية
Adrenodoxin	الأدرينودوكسين
Adsorbed	ممتز، مدمص
Adsorption	الادمصاص، الالتصاق
Aerobic	هوائي
Affinity	ألفة، تآلف
Affinity chromatography	كروماتوغرافيا الألفة أو التآلف
affinity tag	مؤشر أو علامة للتآلف
Aflatoxin	أفلاتوكسين
Ag-Ab interaction	التفاعل المتبادل بين المضاد والمستضد

Agar	الآغار
agarose gel	هلام من «الأغاروز»
Aggregation	تكتل، تجمع
Agonist	روابط تشاركية
Agrobacterium	بكتيريا أجرعية التدرن، أغروبكتيريا
Agrobacterium tumfacien	الأجرعية المورمة
Agrochemical	كيمياء الزراعة
AIDS- associated Kaposi sarcoma	ساركومي كابوسي المترافقة لمتلازمة نقص المناعة المكتسبة
Air lift bioreactor	مفاعلات حيوية ذات مصاعد هوائية
Albumin	الألبومين
Aldolase	أنزيم ألدولاز
Algebraic relations to calculate stoichiometry	العلاقة الجبرية في حساب نسب العناصر - ستوكيومتري
Algorithms	حسابات
alignment	تصفيف
Aliphatic amino acids	أحماض أمينية مفتوحة
Aliphatic hydroxyl carboxylic acid	هايدروكسي حمض الكربوكسيل المفتوحة
Alkaline phospatase	أنزيم الفوسفاتاز القلوي
Alkaline Phosphatase	أنزيم قلوي لتحليل الفوسفات = ألكلاين فوسفاتاز
Alkaline protease	أنزيم محلل بروتيني قاعدي أو قلوي
Alkaliphiles	المحبة للعيش في أوساط قلوية
Alkalophilic	رغبة في النمو في وسط قاعدي أو قلوي
Alkyl chain	سلسله ألكيل
Alkylation	الألكلة
Allele	ألليل أو فردة
Allergens	مثيرات التحسس
Allergic response	رد فعل تحسسي
Alloimmunisation	التمنيع المتباين
Alpha1-anti trypsin	مضاد التريبسين-ألفا 1

Amidase	الأميداز
Amide	الأميد
Amikacin	الأميكاسين
Amino acid sequence alignment	اصطفافات تسلسل لأحماض الأمينية
Amino acids	أحماض أمينية
Amino-adipic acid	حمض الأمينو أديبيك
Aminoglycosides	الغلايكزيدات الأمينية
Ammonium	أمونيوم
Ammonium sulphate	كبريت الأمونيوم
Amoxicillin	الأموكزاسيلين
Amperometric	قياس الأمبيرية
Amphotericin	الأمفوتريسين
Amplification	تضخيم مضاعفة أو تكثير عدد النُسخ
Amylases	أنزيم أميليز محلل للنشاء
Anabolic processes	عمليات بناء وتركيب
Anabolism	التركيب والبناء
Anaerobic metabolism	أيض أو استقلاب لاهوائي
Analysis of the proteome	تحليل البروتيوم (كل بروتينات الخلية)
Analyte	المركب المُحَلَّل
Anaphylactic shock	تفاعل مناعي تحسسي حاد
Anchorage dependent	تعتمد على توفر مرسى
Androstenedione	أندروستينيدايون
Annealing	التحام
Antagonist	روابط تضادية
Anthocyanins	أنثوسيانينات
Anthrax	الجمرة الخبيثة
Anti hemophilic factor	عامل مضاد الناعور
Anti sense gene	جينات مضادة للتعبير
Anti thrombin III	مضاد التجلط III
Antiarythmic	مضاد اضطرابات النظم

Antibiotic resistance	مقاومة المضادات الحيوية
Antibiotic-resistance marker genes	جينات واسمة لمقاومة المضاد الحيوي
Antibiotics	المضادات الحيوية
Antibody	الجسم المضاد
Antibody isotype	الجسم المضاد المتماثل
Anticholinergic	مضاد الفعل الكولينيي
Antigen	مستضد
Antigen -binding fragment/Fab	شدفة الربط بالمستضد/ شدفة Fab
Antigen-presenting cells (APCs)	الخلايا العارضة للمستضد
Antiparallel strand	الجديلة المضادة التوازي
Antisense	معكوس الاتجاه
Antisera	أمصال مضادة
Aplastic anemia	فقر الدم اللا تنسّجي
Apovaricin	أبوفاريسين
Applications	استعمالات، تطبيقات
Approach	مقاربة، توجه
Aquaphilicity	جذب الماء
Arabinanases	أرابيناناز
Arabinose	أرابينوز
Arbitrary	اعتباطي
Arbo viuses	الفيروسات المنقولة بالمفصليات
Archaea	أركيا
Arenes	الأرين
Arginine	أرجينين
Aromatic	عطري
Array	مصفوفة
Artificially	اصطناعي
Asparaginase	الأسبارجيناز
Asparagine	أسباراجين
Aspartate	أسبارتات

Aspects	مظاهر
Assay	معايرة
Assembly reaction	تفاعلات تركيب
ATP	أدينوسين ثلاثي الفوسفات
ATP synthase	أنزيم تصنيع الـ ATP
Attapulgite clays	طين الأتابولجيت
Augmantin	الأوغمانتين
Autocatalytic enzymes	أنزيمات محفزة ذاتياً
Autographa californica	دودة الفضة القيّاسية
Autoimmune	المناعة الذاتية
Automated sequencing	سلسَلة مُؤتمتة
Automation of DNA Sequencing	أتمتة عملية سَلسَلة الـ DNA
Autonomous replication	التضاعف الذاتي المستقل
Autoradiography	التصوير الشعاعي الذاتي
Autoreactive	المتفاعلة ذاتياً
Autotrophic	ذاتي التغذية
Auxins	أوكزينات
Auxotrophic mutant	طفرة (طافر) عونية أو مخلطة التغذية
Avidity	الشَرَه
Avoparicin	أفوباريسين
Azethromycine	أزيثرومايسين
Azoles	الأزول
Baby hamster kidney cells	خلايا كلى طفل الهامستر الصيني
Bacillus	عصيات
Bacitracin	الباسيتراسين
Back pressure	ضغط رجعي
Backward reaction	التفاعل العكسي
Bacterial artificial chromosomes = BAC	كروموسومات بكتيرية اصطناعية
Bacterial selection marker	واسم لانتقاء البكتيريا

Bacteriocins	البكتيريوسينات
Bacteriophage	فاج بكتيري أو عاثية
Bacteriostatic	الحد من نمو البكتيريا
Baculovirus expression vector system (BEVS)	أنظمة نواقل التعبير من الفيروس العصوي
Balance of degree of reduction	توازن درجة الاختزال
Tropophase = Balanced growth	النمو المتوازن - تروبوفيس
banding pattern	نمط الشرائط
bands	أشرطة
base genes	جينات تنشط في وسط قاعدي
Base pairs	أزواج القواعد
Basic biotechnology	أسس التقانة الحيوية
Basic research	البحث العلمي الأساسي
Basket reactor	مفاعل السلة
Batch culture	مزرعة الدفعة
Batch reactors	مفاعلات الدفعة
Batch stirred tank reactor (BSTR)	مفاعل الحوض المخفوق بالدفعة
Bayer-Villiger reaction	تفاعل من نوع Bayer-Villiger
B-cell repertoire	الذخيرة الخلوية البائية
B-cells	الخلايا البائية
Beads	حبوب، بلي، خرزات، كريات صغيره
Beads on a string	«عقد حبيبات على خيط»
Benomy	بينومي
Bentonite	البنتونيت
Benzene	بنزين
Beta-galactosidase	بيتا-غلاكتوزيداز
Bicyclic	ثنائي الحلقة
Bifunctional reagents	كواشف ثنائية الوظيفة
Binary fission	انقسام شطري
Binding groove	أخدود الربط

Bioactive	ذو نشاط حيوي
Biocatalyst	حفاز/ محفز حيوي
Biocompatablity	موائمة حيوية
Biodegradable	تآكل وتفكك حيوي
Biodiversity	التنوع الحيوي
Bio-geochemical	جيوكيمياء الحيوية
Bioinformatics	المعلوماتية الحيوية
Biolistic transformation	التحوير بالقصف
Biolistics	مقذوفات حيوية
Biomarkers	مؤشرات حيوية
Biomass	الكتلة الحيوية
Biomass specific conversion rate of compound i	سرعة التحويل النوعي في الكتلة الحيوية للمركب «i»
Biomedicine	الطب الحيوي
Biopharmaceuticals	المستحضرات الدوائية الحيوية
Bioprocessing	العمليات التسلسلية الحيوية
Bioprospecting	التنقيب الحيوي
Bioreactor	المفاعل الحيوي
Biorefiners	معامل تكرير حيوي
Bioremediation	المداواة الحيوية
Biosensors	وسائل وأدوات تحسس حيوية
Biosynthesis	البناء أو التصنيع أو التمثيل الحيوي
Biotechnology	التقانة الحيوية
Biotic elicitor	محرضات حيوية
Biotin	بايوتين
Biotransformation	تحويل حيوي
Bisacrylates	ثنائي الساكريلات
Black box models	نماذج الصندوق الأسود
Bleaching chemicals	كيماويات مبيضة
Block/sheet moulding	قولبة بالبلوك أو بالصفيحة

Blood clotting agent	عامل تخثرالدم
Blood group	فئة دم
Blotting	وصم
Blunt	غير ناتئة
B-lymphocytes	ليمفاويات بائية
Bomyx mory virus	فيروس دودة الحرير
Boving spongiform encephalopathy	المرض الدماغي الإسفنجي عند الأبقار
Breaking self-tolerance	انهيار التحمل الذاتي
Breeding	الاستيلاد
Brewing	عملية إنتاج (الجعة) البيرة
Bright field microscopy	مجهر الحقل المضيء
Broad spectrum	واسع الطيف
Bronchitis	التهاب القصبات
Broth	مرق
Budding viruses	فيروسات متبرعمة
Buffer	دارئ أو محلول
Builders of detergents	أساس المنظف
Bulk	بكمية كبيرة
Butanediol	بيوتاين ديول
Butanol	بيوتانول
Butyrate	بيوتيريت
Butyrate kinase	أنزيم فسفرة بيوتيريت
Butyric acid	حمض بوتيريك
Butyryl-CoA	بيوتريل كوانزيم A
By product	منتجات ثانوية، فضلات
C13-NMR	الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13
Calcium alginate	ألجينات الكالسيوم
Calf stomach	معدة العجل
Callus	جُسْأة، الكالوس
cAMP	أدينوزين حَلَقي أحادي الفوسفات

Camphor	كافور
Caphalosporin C	سيفالوسبورين C
Capillary	جهاز شعري
Capsule	علبة، كبسولة
Carbamate kinase	كاربامايت كاينيز
Carbapenems	الكربابينيمات
Carbohydrase	أنزيمات محللة للكاربوهيدرات أو كاربوهيدرايز
Carbohydrates	كربوهيدرات
Carboligase activity	فعالية ربط بالكربون
Carbon catabolite repression	«التثبيط بمركبات هدم الكربون»
Carbon conversion coefficient	«درجة تحويل الكربون»
Carbon Intermediates	مواد كربون أولية وسيطة
Carbovir	الكاربوفير
Carboxykinase phosphoenolpyruvate	أنزيم فسفرة 3 فوسفواينول بايروفيت كربوكسيل
Carboxypeptidase A	الكاربوكسيبيبتيداز A
Cardiac muscle necrosis	تنكرز (نخر) عضلة القلب
Cardiotonic	مقوٍ للقلب
Carotenoid	الكاروتينويد
Carrageenans	الكوراجينات
Carrier protein	بروتين «عتَّال»، حامل
Cassetes	كاسيتات
Catabolic Pathways	مسارات الأيض الهدمي (التكسير)
Catabolic repression	تثبيط عمليات الهدم
Catabolism	التكسير والهدم
Catabolite	الهادم
Catabolite activator protein - CAP	بروتين محفِّز منتجات الهدم
CRP – Catabolite receptor protein	بروتين المستقبل لمنتجات الهدم
Catabolite repression	تثبيط بمنتج الهدم أو التثبيط بالمركب الناتج من عمليات الهدم

Catalase	الكتالاز
Catalytic acitivity	نشاط التسريع أو التحفيز
Catalyze	يحفز أو يسرِّع
Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV35S)	فيروس موزاييك القرنبيط
cDNA (Complementary DNA)	DNA مُكمِّل متمم
Cell capsule	كبسولة الخلية
Cell Culture	زراعه الخلايا، مزرعة خلوية
Cell cytosmears	اللطخات الخلوية
Cell density	الكثافة الخلوية
Cell elongation	التمدد الخلوي
cell fraction	جزء محدد في الخلية
Cell fusion	الاندماج الخلوي
Cell lines	خطوط خلوية
Cell lysates	الحُلالة الخلوية
Cell membrane	غشاء خلوي
Cell retention	استبقاء خلوي
Cell shrinking	انكماش الخلية
Cell suspension	معلق خلايا
Cell transformation	التحويل الخلوي
Cell wall	جدار خلوي
Cellobiohydrolase	سيلوبيوهيدروليز
Cell-to-cell contact	التماس الخلوي
Center for drug evaluation and research (CDER)	مركز الأبحاث وتقيم الأدوية
Centrifugation	الطرد المركزي، النبذ المركزي
Cephalosporin	سيفالوسبورين
Cephalosporinase	أنزيمات السيفالوسبوريناز
Cephalosporium	سيفالوسبوريوم
Cephem	سيفيم

Chain elongation	تطويل السلسلة
Channel protein	بروتين القنوات
Chaperones	بروتينات مرافِقة
Chelators	مخلبيات كيميائية
Chemiluminescent	ذو تفاعل كيميائي ضوئي
Chemostat	حالة الاستقرار الكيميائي - كيموستات
Chemotrypsin	كيموتريبسين
Chimaeric, chimeric	هجينة كيمرة أو خيميرية
Chinese hamster ovary cells	خلايا مبيض الهامستر الصيني
Chip	رقاقة
Chiral	الكيرال، غير متناظر مرآتياً
Chitin	كايتن أو الشيتين
Chitosan	الشيتوسان أو الكيتوسان
Chlamydial	المتدثرية
Chlorination	الكلورة
Chlorotetracyclin	الكلوروتيتراسايكلين
Chromatin	كروماتين
Chromogenic	تتحول لمادة ملونة
Chromosome	صبغي - كروموسوم
Chronic granulomatous disease (CGD)	الورم الحُبَيْبِي المزمن
Chymosin	أنزيم التجبين (الكيموزين)
Circular dichroism	امتصاص ضوء مستقطب دوراني
Circular DNA molecule	جزيء DNA دائري - حلَقي
Citrate	ستريت
Citrate Synthase	أنزيم تصنيع الستريت (سينثاز)
Clarification	تصفية
Clarithromycin	كلاريثرومايسين
Clavams	الكلافامات
Clavolanic acid	حمض الكلافولانيك

Clearance	التخلص، التنقية
Cleavage	تشطر
Clinical chemistry	الكيمياء الطبية
Clinical development	التطوير الدوائي
Clinical trials	الاختبارات السريرية
Clonal cell line	خط خلوي نسلي
Clones	نسيلات، كلونات
Cloning	تنسيل، انتساخ، كلونة
Cluster designation (CD)	لقب التجمع
Coalescing	اندماج
Codon	شفرة - كودون
Codon bias	درجة انحياز الشفرة
Coefficient	مُعامِل
Co-factor	عامل مساعد
Cohesive	متراكبة قابلة للالتصاق
Collagen	الكولاجين
Colloidal	أشكال غروانية أو غروية
Colonies	مستعمرات
Colorectal cancer	سرطان القولون والمستقيم
Column of Sepharose-Glutathione	عمود من السفروز الملصق عليه غلوتاثيون
Combination	إندماج، اتحاد
Combinatorial libraries	مكتبات اندماجية
Compartmentalization	الحجيرات المستقلة
Complement cascade	تسلسل المتممات
Complementary determining regions CDR (1, 2 and 3)	مناطق تحديد التكامل
Complementation	التكملة أو التتام
Complementation of defect in the cloning host	تكملة نقص في خلايا المضيف
Complements	المتممات، التمائم او التميمات

Complexity	مدى تعقيد
Computer soft ware	برمجيات
Concentration	التركيز
Confocal microscopy	مجهرية البؤر المتحدة
Conjugation	اقتران
Conjugative plasmid	بلازميد الاقتران
Connective tissue	النسيج الضام
Consensus interferon	انترفيرون متفق عليه أو إجماعي
Conservation constraints	مقيِّدات مبدأ المحافظة
Conservation principles	مبادئ المحافظة
Conserved	«محفوظة»
Conserved strand	جديلة قديمة محفوظة
Constant	ثابت
Constitutive	ذو نشاط دؤوب مستمر
Continuous culture	المزرعة المستمرة
Continuous culture	نمط تغذية مستمرة
Continuous stirred tank reactor (CSTR)	مفاعل الحوض المخفوق المستمر
Continuously stirred tanks	أحواض مستمرة التحريك
Control	شاهد
Controlled pore glass	زجاج مضبوط الثقوب
Conversion	تحوّل
Core	جوهر، أساس، قلب هو تب الشيئ
Corn steep liquor	شراب الذرة الحاد
Coronary angioplasty	مرض رأب الوعاء التاجي
Cortisol	الكورتيزول
Cos Site = Cohesive ends	أطراف ناتئة قابلة للصق بموقع cos
Cosmid Vector	كوزميد ناقل
Covalent binding	ربط تشاركي أو تساهمي
Crawn gall	التدرن التاجي

Creutzfeldt–Jakob disease	مرض جاكوب الكروتسفيلدت
Critical dilution rate	معدل التخفيف الحرج
Cross-linked enzyme aggregates-CLEAs-	تكتلات أنزيم مشبوكة
Cross-linked enzyme crystals-CLECs-	بلورات أنزيم مشبوكة
Cross-linked enzymes (CLEs)	أنزيمات مشبوكة
Cross-linked spray-dried enzymes (CSDEs)	أنزيمات مشبوكة مجففة بالترذيذ
Cross-linking	تشابك
Cross-Over	التقاطع – عبور
Cross-sectional area of the downcomer	مساحة المقطع العرضي للنازل
Crotonase	كروتونيز
Crown ethers	الإيثير الإكليلي
Crude preprations	مستحضرات غير متقنة الصنع
Crystal protein	بروتين متبلور
Crystallisable fragment (Fc)	الشدفة المتبلورة (شدفة Fc)
Crystallization	عملية التبلور
Crystallography	علم بلوريات
CT-box	صندوق CT
Cultivation	عملية الزرع
Culture collections	مجموعات الزرع
Curve	منحنى
Cyclic diphosphoester	حَلقي ذو رابط فوسفوإستير ثنائي
Cyclic peptides	بيبتيدات حلقية
Cyclodextrins	الديكسترينات الحلقية
Cytochemical assay	معايرة كيميائية خلوية
Cytokinins	اليستوكينينات
Cytoplasic membrane	غشاء سيتوبلازمي
Cytoplasm	السيتوبلازم

Cytosine	سيتوززين
Cytosole	العصارة الخلوية، السيتوزول
Cytostatic	مثبت للخلايا
Dairy animals	الحيوانات الحلوبة
D-amino-acids	للأحماض الأمينية ذات الوضعية D
Daptomycin	دابتومايسين
Darwanian optimization algorithm	حساب الأمثلة الدارْوَني
Data bases	قواعد البيانات
Daughter cell	الخلية الابنة
Deacetylated	إزالة مجموعة الاسيل
Deactivation	تعطيل
Decane	ديكان
Decarboxilase	ديكاربوكسيلاز
Decoded	يُترجَم
Deep vein thrombosis	تجلط الدم في الأوعية العميقة
Degenerate	متكرر
Degree of reduction	درجة الاختزال
Dehydrgenase	نازعة الهيدروجين (ديهادروجيناز)
Delayed release feature	خاصية الاطلاق البطيء
Deletion	محو
Denaturant	ماسخ
Denaturation	مسخ أو تفكك البنية أو الهيكل - فصل الجدلتين عن بعضهما البعض
Dendritic cells	الخلايا المتشجرة
Denitrification	عملية طرد النايتروجين
Denitrifying growth system	نظام نمو طارد للنيتروجين
Deoxynucleotide triphosphates	نيوكليوتايد الثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسيجين
Depsipeptide	ديبسيبيبتايد
Derived	اشتُق، استُنتِج
Dermatophytes	الفطور الجلدية

Detection system	نظام الكشف
Detergent	منظف
Diagnostic agents	كواشف تشخيصية
Diagnostics	طواقم، كواشف، وسائل تشخيصية
Dialysis	الانفكاك
Diauxic growth	نمو باستهلاك مصدرين
Diazo	مركبات داي آزو
Diazotization	التدييز
Dielectric constant	ثابت عزل الكهرباء
Dienes	الدايينات
Differential Controller proportional integral	المسيطر التفاضلي التكاملي المتناسب
Differential equation	معادلة تفاضلية
Differential Interference Contrast	تعاكس التداخل التبايني
Differentiation	التمايز - التخصص
Digoxygenin	ديكوكسيجنين
Dihydroxyacetone	ديهايدروكسي أسيتون
Diisocyanates	ثنائي إزوسيانات
Dilution rate	معدل التخفيف
Dimer	ثنائي الجزيئة (جزيئتان مرتبطتان بأصرة هيدروجينة)
Dimethyl sulfoxide	ثنائي ميثيل السلفوكسيد
Dimorphism	ازدواجية الشكل
Diols	الدايول
Dioxygenase	داي أوكسيجيناز (ثنائي الأوكسيجيناز)
Diphtheria vaccine	لقاح الدفتيريا
Diploid	ثنائي الصيغة الصبغية
Direct gene transfer by particle bombardment	نقل الجينات مباشرة بواسطة قصف الجسيم
Directed evolution technology	تقنية التطور الموجه

Directed or hybrid biosynthesis	التصنيع الحيوي المُوجّه أو المهجن
Dissociation	انفصال الجدلتين عن بعضهما البعض
Dissociation constant	ثابت التفكك - ثابت الانفصال
Dissolved oxygen tension	توتر الأوكسيجين المنحل أو المذاب
Disulphide bond	رابطة ثنائية سلفيد
Diterpenes	التربينات الثنائية
Diversity segment/D-segment	قطعة التنوع/ القطعة-D
DNA array technology	تقانة مصفوفة الـ DNA
DNA Cloning	انتساخ الـ DNA
DNA fragment	شدفة DNA، قطعة DNA، جزء DNA
DNA hybridization	تهجين الـ DNA
DNA Labeling	وسم الـ DNA
DNA libraries	مكتبات الـ DNA
DNA polymerase	أنزيم بوليميراز الـ DNA
DNA probe	مسبار أو مجس الـ DNA
DNA repair mechanism	عملية تصليح للـ DNA
DNA Sequencing	دراسة تسلسل الـ DNA - سَلسَلة الـ DNA
DNA shuffling	خلط الـ DNA او التعامل معه
DNA taq polymerase	أنزيم بوليميراز الـ DNA تاك
Domains	قطاعات
Donors	مانحات
Dormant phase (G_0 phase)	طور السبات
Double cross-over	عبور أو تصالب ثنائي أي مزدوج
Double cross-over recombination	تأشيب تقاطعي (عبور) مزدوج
Double cross-over recombination for allele replacement recombination	التأشيب التقاطعي المزدوج لاستبدال الفردة
Double index	حرفين رمزين
Double stranded	مزدوجة الجديلة
Doubling time	وقت التضاعف
Down pumping hydrofoil	رقاقات مائية ذات ضخ سفلي

Downcomer	النازل
Downstream	في موضع يتلو (تال لنقطة محددة) - في أسفل موقع
Downstream processing	العمليات المتسلسلة المتعاقبة باتجاه المصب
Doxycyclin	الدوكسيسايكلين
Draw back	انسحاب
Drosophila melanogaster	ذبابة الخل
Dry weight	وزن جاف
Dyes	أصبغة
Ecologically sensitive	حساس بيئياً
Ectopic	موقع غير محدد
Effector functions	وظائف المستجيب
Effectors of the immune system	مستجيبات للجهاز المناعي
electrical gradient	تدرج كهربائي
Electrode	قطب كهربائي
Electrofusion techniques	تقنيات الاندماج الكهربائية
Electron donor	معطي الإلكترون
Electron transport chain	«سلسلة نقل الإلكترون»
Electron transport-coupled phosphorylation System = ETP	نظام انتقال الإلكترون المرافق للفسفرة
Electrophoresis	الهجرة الكهربائية، الرحلان الكهربائي
Electroporation	الثقب الكهربائي
Elemental analysis	التحليل الأولي
Elicitor	محرّض، محفز
ELISA	المعايرات المناعية الممتزة المتصلة بالانزيم
Ellipse	إهليج
Embryonic stem cells	خلايا جذعية جنينية
Empirical	تجريبية
Emulsion	مستحلَب
Enantiomer	مصاوغة مرآتية

Enantiomers resolution	تصميم مركبات المصاوغة المرآتية
Encapsulated	مغلف، محاط بتغليفات
Encoding	يُشفر
Endogenous metabolism	الأيض الداخلي
Endogenous respiration	التنفس الداخلي
Endoglucanase	إندوكلوكانيز
Endonuclease Mapping	رسم خريطة قَطْع الإندونيوكلياز
Endonucleases	أنـزيـمـات اقـتـطـاع نـيوكـليوتـيدي داخـلية (إندونيوكلياز)
Endopeptidase	أنزيمات بيبتيداز داخلية (إندوبيبتيداز)
Endoplasmic reticulum	الشبكة الإندوبلازمية
Endosomal vesicales	حويصلات إندوزومية
Endothermic	مُتصَّة للحرارة أو مُستهلِكةٌ للطاقة
Energy currency	«العُملة النقدية للطاقة»
Energy dissipation	بعثرة الطاقة
energy yielding	مُنتِجة ومحررة للطاقة
Engineering genes	هندسة الجينات
Enrichment techniques	تقنيات الاخصاب
Enterobacteria	البكتيريا الداخلية
Enterococcus	المكورة المعوية
Enthalpy	الطاقة الداخلية - إنثالبي
Entities	كينونات
Entrainers	المُقِلات أو الساحبات
Entropy	درجة الإعتلاج - إنتروبي
Enzyme assay or immunodetection	اختبارات كشف أنزيمية أو مناعية
Enzymetic deamination	نزع مجموعة الأمين أنزيمياً
Ephedrine	الإفيدرين
Epidermal growth factor	عامل نمو البشرة
Epithelia cells	الخلايا الظهارية
Epitopes	حواتم

Epoxy resins	راتنجات الإبوكسي
Erlenmayer flask	دورق مخروطي (دورق إيرلنماير)
Erythromycin	إريثرومايسين
Erythropoietin	الإريثروبوتين
Essential oils	الزيوت العطرية الأساسية
Expressed Sequence tag= EST	إشارة السلاسل المُعبَّرة
Esterase	الإستراز
Ethane g	إيثاين غاز
Ethanol	إيثانول
Ethylene glycol	إثيلين كليكول
Eubacteria	بكتيريا حقيقية
Eugenics	الضغوط لتحسين النسل
Eukaryolic cells = eukaryotes	خلايا ذوات نواة حقيقية
European agency for the evaluation of medical products (EMEA)	الوكالة الأوروبية لتقييم المنتجات الطبية
European inventory of exiting commercial substances (EINECS)	قائمة جرد المواد التجارية المتوافرة الأوروبية
Evolutionary mechanisms	آلية ومراحل التطور
Excipients	السواغات
Excision	استقطاع استئصال
Exogenous	خارجية المنشأ
Exon	إكسون
Exopeptidase	أنزيمات بيبتيداز خارجية
Exothermic	يُحرر حرارة
Expendase	إكسبنداز
Experimental system	النظام التجريبي
Explant	المزدرع
Exponential phase	الطور التصاعدي أو الأسي
Expression	التعبير
Expression cassette	كاسيت التعبير

Expression cloning	انتساخ تعبيري، كلونة تعبيرية
Expression vector	ناقل تعبيري
Extension	إطالة بالبلمرة
Extracellular	خارج خلوي
Extrachromosomal	خارجة عن الكروموسوم
Extremophiles	الكائنات المحبة للظروف المتطرفة
Extrusion	القذف
F pilus	شعيرات على السطح
F1 hybrid	هجين الجيل الأول
Facilitated transport	نقل مُسهَّل
Facultative anaerobe	لاهوائية اختيارية
Fatty acids	أحماض دهنية - أحماض شحمية
Fatty acyl triester glycerol	شحوم كليسيرول ثلاثي الإستر
Fatty acyl-CoA dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من اسيل كوA الشحمي
Fatty acyl-CoA esters	إستر أسيل كوانزيم A الشحمي
Fatty acyl-CoA Oxidase	أنزيم مؤكسِد أسيل كوA
Fatty acyl-CoA Synthase	أنزيم تصنيع أسيل كوA
Fc receptor	مستقبل الشدفة المتبلورة، مستقبل شدفة Fc
Fc region	الجزء القابل للتبلور
Feasibility	القابلية للتطبيق
Fed-batch culture	مزرعة الدفعة المغذاة
Fed-batch feeding	التغذية على دفعات
Federal Drug administration (FDA)	إدارة الدواء الاتحادية
Feed back	رجعي
Feedback inhibition	التثبيط الارتجاعي
Feedstock	المواد الأولية أو المخزون
Femtograms	فيمتوغرام
Fermentation	التخمير
Fibre wet-spinning	الغزل المرطب الليفي
Fibrin	ليفين، فبرين

Fibroblast	الأرومة الليفية
Filamentous fungi	فطريات خيطية
Filarial	الداء الفيلاري
Filtration	ترشيح، فلترة
Fine chemicals	الكيماويات الدقيقة
Finger print	بصمة
First order	من الدرجة الأولى (متناسب بشكلٍ مباشر)
First-order differential equation	معادلة تفاضلية من الدرجة الأولى
Flavin	فلافين
Flavonoids	فلافونويدات
Flocculation	تلبيد
Flouroquinolones	الفلوروكوينولونات
Flow cytometry	تقنية قياس الانسياب الخلوي
Flow diagram	مخطط انسيابي
Flow rate	معدل الجريان
Fluid dynamic modeling	برامج نمذجة ديناميكية سائلة
Fluid granulation towers	أبراج تحبيب السوائل
Fluid mechanical stress	إجهادات ناجمة عن ميكانيكية السوائل
Fluidized bed	القعر المسيّل
Fluorescent	مضيئة فلوريسية
Fluorescent dye	صبغة أو ألوان مضيئة فلورسية
Fluorimeter	جهاز قياس الفلورة
Fluorogenic	متفلورة
Flux	التدفق
Foldases	أنزيمات مساعدة للإلتفاف
Folding	انطواء - التفاف
Follicle stimulatory hormone	الهورمون المحفز للجريب
Food additives	المضافات الغذائية
Food allergies	التحسس أو الحساسية للأطعمة
Food irradiation	إشعاع أو تشعيع الغذاء

Food Standard Agency	وكالة معايرة الغذاء
Formaldehyde	فورملديهايد
Formamide	فورمامايد
Formate	فورمايت
Formate dehydrogenase	أنزيم مزيل هايدروجين من الفورميت
Formation	تشكيل
Formic acid	حمض النمل
Formulation	تصبيغ، تشكيل المستحضرات
Formyl-tetrahydrofolate synthase	أنزيم تصنيع فورميل تتراهايدروفوليت
Forward angle light scatter (FALS)	تشتت الضوء بزاوية أمامية
Forward reaction	التفاعل الأمامي
Fouling flims	الأغشية المترسبة
Fraction	قسم، جزء او شظية
Fragmentation	تشظي (تكسير)، تشديف
Fragments	شدف، أجزاء، شظايا
Frame shift	انزياح في إطار القراءة
Framework regions	مناطق الهيكل
Free flowing powders	مساحيق طليقة
Free medium	الوسط الحر (الخالي من الخلايا)
Free suspensions	المعلقات الحرة
Free-energy reduction	اختزال حر الطاقة
Frequency of transcription initiation	تردد ابتداء عملية النسخ
Fresh medium	وسط نقي
Fructose 1,6-bisphosphatase	فركتوز1–6 بيسفوسفاتيز
Fuelling reaction	تفاعلات تزويد بالوقود
Fumarase	فيوماريز
Fumarate	فيومارايت
Fumaric acid	حمض الفوماريك
Function	دالة
Functional	وظيفي، فعال، فاعل

Functional cross-reactions	تفاعلات وظيفية متقاطعة
Functional domain	قطاع الفاعلية
Fungal transformation	تحويل الفطريات
Fungi	فطر
Fungioststic agents	مثبطة لنمو الفطور
Fusion construct	بنية اندماجية
Fusion proteins	بروتينات مندمجة
Fusion tail	ذيل اندماجي
Fv fragments	شدف Fv
G1 phase	طور تصنيع البروتين-الطور التحضيري
G3P Glyceraldehyde 3-phosphate	غليسيرالديهايد 3- فوسفات
Galactanases	غالاكتاناز
Gas chromatography (GC)	الكروماتوغرافيا الغازية
Gelatin	الجيلاتين
Gelatinisation	عملية التحويل إلى هلام
Gellan	الجيلان
Gene	جين أو مورث
Gene cloning	انتساخ الجين
Gene clusters	عناقيد (تجمع) الجينات
Gene disruption	تمزيق المورث
Gene expression	التعبير الجيني
Gene expression patterns	نمط التعبير الجيني
Gene fusion	التحام الجينات - صهر جيني
Gene library	المكتبة الجينية
Gene linkage	الارتباط الجيني
Gene silencing	إسكات الجين
Gene therapy	العلاج الجيني
Gene transfer	نقل الجينات
Generally recognized as safe (GRAS)	معترف بأمانها بشكل عام
Generation time	عمر الجيل

Generic antibiotics	عموم المضادات الحيوية
Genethics	أخلاقيات الهندسة الوراثية
Genetic code	الشفرة الوراثية
Genetic complementation	التكملة أو التتام الجيني
Genetic databases	قواعد المعلومات الوراثية
Genetic Engineering	الهندسة الوراثية
Genetic manipulation	التلاعب الجيني، الوراثي
Genetic modification	التعديل الوراثي
Genetic recombination	التأشيب الجيني
Geneticaly modified organisms	كائنات معدلة وراثياً
Genetics	علم الوراثة
Genome	جينوم - مُجمل المعلومات الوراثية في الخلية
Genome management and analysis	تدبير الجينوم وتحليله
Genome sequence	التسلسل الجيني الكامل
Genomic	تقنية الجينوم
Genomic and Gene libraries	مكتبات الجينوم ومكتبات الجين
Genomic libraries	مكتبات جينية
Genotype/Genotypic	هوية جينية - نمط جيني أو وراثي
Germ-line	خلايا جنسية أو تكاثرية، خط البذرة
Germ-line gene therapy	علاج الجيني على الخلايا التكاثرية بمراحل نمو أولية
Gibbs energy dissipation	تبدد الطاقة عند «جبس»
Glcolysis	عملية تحلل السكر
Global carbon cycle	دورة الكربون الكونية
Global worming	الاحتباس الحراري
Globular domain	القطاع الكروي
Globular protein	بروتن كروي
Glucans	غلوكان
Glucoamylase	الغلوكوأميلاز
Glucocarticoids	المركبات القشرانية السكرية

Gluconate	كلوكونيت
Gluconeogenesis	عملية نشوء سكر جديد - غلوكونيوجنيسيس
Gluconic acid	حمض كلوكونيك
Glucose -6- phosphate dehydrogenase	أنزيم مُزيل للهيدروجين من (ديهايدروجيناز) الغلوكوز 6-الفوسفات
Glucose 6-phosphaste	غلوكوز 6-فوسفات
Glucose-6-phsphate isomerase	أنزيم إيزوميراز الغلوكوز 6-فوسفات
Glutamate	غلوتمايت
Glutamine	غلوتامين
Glutaraldehyde	غلوتارالديهايد
Glutaryl cephalosporins	غلوتاريل سيفالوسبورينات
Glutathione	غلوتاثيون
Glutathione-S-Transferase	غلوتاثيون-S-ترانسفرايز
Glycan	سكر معقد - غلايكان
Glyceraldehyde 3 phosphate	3-فوسفات الغليسرالديهايد
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	أنزيم مزيل الهايدروجين عن غليسيرالديهايد ثلاثي الفوسفات
Glycerol	غلسيرول
Glycobiology	البيولوجيا الغلاكوجية
Glycobiotechnology	التقانة الحيوية الغلايكوجية
Glycohydrolase	غلايكوهيدرولاز
Glycol proteins	بروتينات غلايكول
Glycolysis	تحليل الغلوكوز - غلايكوليزس
Glycolytic flux	تدفق مسار تحليل السكر
Glycopeptides	بيبتيدات سكرية
Glycoproteins	غلايكوبروتين - بروتينات سكرية - كاربوهيدرات معقد متحد مع البروتين
Glycosyl transferase	ترانسفيراز الغلايكوزيل
Glycosylation	السَّكرلة، ربط السكريات بالبروتين، إضافة الغلايكوزيل

Glycosyltransferases	ناقلات الغلايكوزيل
Glycosynthases	الغلايكوسينثاز
Glyoxylate	غلايوكزايلات
Glyoxylate bypass	مسار غلايوكزيلات البديل
GM microorganisms	كائنات مجهرية معدلة وراثيا
Golgi body	جسم غولجي
Good manifacturing practice	الممارسة التصنيعة الجيدة
Gout	داء المفاصل
Gradient	تدرج
Gram-negative	سلبية الغرام
Gram-positive	إيجابية الغرام
Granularity	حُبيبية
Granulocytes- colony stimulating factor	العامل المحفز لتشكل مستعمرات الكريات البيض الحبيبة
Graphite	الجرافايت
Gravitational acceleration	التسارع الجذبي
Green fluorescent protein	البروتين ذو الفلورة الخضراء، بروتين أخضر مشع - مضيء أو فلوري او فلوروسيني
Green replacements	الاستعاضات الخضراء
Grid and parallel processing	المعالجة المتوازية والشبكية
Griseofulvin	الغريسيوفولفين
Growth connected products	منتجات متصلة بالنمو
Growth rate	سرعة أو معدل النمو
Guanine	جوانين
H_2S	سلفور الهيدروجين
Haemolytic disease of the newborn (HDN)	مرض تحلل خلايا الدم الحمراء لدى حديثي الولادة
Haemophilus	المستديمة النزلية
Haemotopoetic growth factors	مجموعة عوامل نمو منشئات الدم
Hairy cell leukemia	لوكيميا مشعرّة الخلايا

Hairy roots	الجذور الشعَرية
Half-inactivation	تعطل الفعالية النصفي
Half-life	نصف العمر
Halogenations	هلجنة
Halophiles	المحبة للأملاح
Haploid	أحادي المجموعة الصبغية
Hapten	هابتن
Harsh chemicals	الكيماويات الجالفة/ القاسية
HCl	حمض الهيدروكلوريك
Heavy chain	السلسلة الثقيلة
Hemophilia	داء الناعور
Hepatitis B	التهاب الكبد من النوع B
Hepatitis viruses	فيروس الالتهاب الكبدي
Herbicide	مبيدات الأعشاب
Heterocyclic amine	حلقات غير متجانسة تحتوي على الآزوت
Heterogeneous	متغاير
Heterologous	متغاير أو مختلف الأصل، غريب
Heterotrophic	تتغذى على مواد عضوية
Hexadecane	هيكزاديكان
Hexokinase	هيكسوكاينيز
Hexose monophosphate shunt	تحويلة الهكسوز أحادي الفوسفات
High frequency = Hfr	تردد عالٍ
High throughput technologies	تقنيات ذات الدفق العالي
High value proteins	بروتينات عالية القيمة
Higher eukaryotes	الكائنات الراقية حقيقية النواة
Higher-order aggregates	درجات أعلى من التكتلات
High-shear impellers	دافعات الاحتكاك العالي
High-throughput screening	غربلة عالية الأداء
Histidine	هستيدين
Histidinol dehydrogenase	أنزيم إزالة الهيدروجين من هيستيدينول

Histones	هيستونات
HIV	الفيروس المسبب لنقص المناعة المكتسبة
Hollow fiber	الألياف المجوفة
Hollow fibre reactor	مفاعل ليفي مجوَّف
Homologous	متجانس
Homologous recombination	التأشيب المتناظر أو المتماثل أو المتجانس
Homology	درجة التشابه
Hops	حشيشة الدينار
Hornblend	الهورنبلند
Host	المضيف، العائل
HPLC	الكروموتوغرافيا السائلة العالية الأداء، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي
Human body fluids	سوائل جسم الانسان
Human embryonic kidney	كلى مضغية بشرية
Human Genome Project	مشروع الجينوم البشري
Human growth hormone	هرمون النمو البشري
Human serum albumin	زلال المصل البشري
Humanised antibodies	أجسام مضادة مؤنسنة
Hybridisation	التهجين
Hybridoma cells	خلايا ورمية هجينة
Hydostatic	الهيدروستاتي (توازن المائع)
Hydrocarbons	هيدروكربون أو كربون مهدرج
Hydrodynamic	الهيدروديناميكي
Hydrofoil	الهيدروفويل
Hydrogel	هلام مائي
Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين
Hydrolase	هيدرولاز
Hydrolysis	تحليل مائي
Hydrophilic	مُحب للماء
Hydrophilicity	حُب الماء

Hydrophobcity	كره الماء (طرده)
Hydrophobic	كاره للماء
Hydroxyl	الهيدروكسيل
Hydroxylate	إضافة مجموعة الهايدروكسيل
Hydroxymuconic semi aldehyde	هايدروكسي ميوكونك شبيه الألديهايد
Hygromycin	هايكرومايسين
Hyperbolic	بشكل مفرط
Hyperglycosylation	المبالغة بالسَّكرلة أو بإضافة مجموعة الغلايكوزيل
Hyper-thermophilic	مُحب لدرجات الحرارة المرتفعة جداً
Hyper-variability	تغير مفرط
Hyphae	الغصينات
Hyphal	حالة الخيوط
Idiophase	مرحلة نمو تتميز بالسكون
Immobilization	تقييد الحركة
Immune complex	مركب (معقد) المناعة
Immune donor	مانح مناعة
Immune functions	وظائف المناعة
Immune response	الاستجابة المناعية
Immune system has checks and controls	لدى جهاز المناعة مراكز توقيف وضبط
Immunisation	تمنيع
Immunoadhesins	اللاصقات المناعية
Immunochemical	المناعة الكيميائية
Immunocyto chemistry	الكيمياء الخلوية المناعية
Immunodiffusion reactions	تفاعلات تقنية الانتشار المناعي
Immunogenicity	استمناع
Immunoglobulin	غلوبولين مناعي، غلوبولين المناعة
Immunometric assays	معايرات قياس مناعية
Immunoprecipitation	الترسيب المناعي
Immunosuppress	الكبت المناعي

Immunotoxins.	السموم المناعية
Impeller	الدافعة الميكانيكية (المسيّرة)
Impregnation of a porous support	نقع الداعم المسامي
Improper folding	التفاف بروتيني غير سليم
In silico analysis	تحليل بواسطة البرامج المعلوماتية أو «إنسيليكو»
In situ	في موضعها الأصلي، في الموقع
In vitro	في الزجاج، في الأنبوب
In vitro packaging	تغليف بغلاف فيروسي في الزجاج
In vivo	داخل الجسم، في الحي
Inclusion bodies	أجسام ضمنية أو حويصلية
Incubate	تحضين
Index	دليل
Indicator	مؤشر
Induce	يطلق، يحفز، يتسبب
Inducible promoter	محرك قابل للتحفيز - مُحرك قوي يمكن تحفيزه
Inert	سطح خامل أو جامد
Infection	عدوى
Infectious agents	عوامل معدية
Infectious diseases	الأمراض المعدية
Inflection point	نقطة الالتواء
Inflow	التدفق الداخل
In-frame	في إطار الترجمة الصحيح
Infused	يتسرب
Inherently	موروث
Inhibitor	مثبط
Inhomogeneity	عدم تجانس
Initial	أولي، أساسي
Inlet flow rate	معدل الجريان في المدخل
Inlet medium	المدخل
Inoculation	تلقيح

Input	الداخل
Insertion mutation	طفرات إقحامية
Insertional Inactivation	التطفير بزرع قطعة من DNA في الجين بحيث يتغير التسلسل ويعطل الجين
Inserts	مدرجات، مدغمات
In-silico analysis	تحليل بواسطة البرامج المعلوماتية أو «إنسيليكو»
Insulin-like growth factor-I	عامل النمو 1 الشبيه بالأنسولين
Integrase (Int)	أنزيم الاندماج أو إنتغرايز
Integration Vectors	نواقل إندماج
Integrative transformations	التحويل الإندماجي
Intercept	تقاطع
Inter-esterification	الأسترة البينية
Interfacial phenomenon	ظاهرة تكوّن السطح البيني
Interferences	تداخلات (تشويش)
Interferon	أنترفيرون
Interleukin (IL)	أنترلوكين
Intermediate	وسيط
Intermediate compound	مركب وسيط، متوسط
intermediate precursors	مواد وسيطة وجزيئات سالفة
Intracellular	داخل خلوي
Intron	أنترون
In-vitro cloning	انتساخ في الأنبوب أو في الزجاج
Ion	أيون
Ion exchangers	مبادِلات أيونية
Ionization	التأين
Ionotropic gel	هلام الأيونوتروبيك
Irreversible	غير المنعكس
Isocitrate	شبية الستريت
Isocitrate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من شبيه الستريت
Isocitrate lyase	أنزيم مُحلِّل شبيه الستريت

Isoelectric point	نقطة تَسَاوي الشحنات
Isolates	عزلات
Isomerase	يزومراز
Isomerization	تصاوغ (تزامر)
Isooctane	الأيزوأكتان
Isopeptide bond	رابطة أيزوبيبتيدية
Istaxanthin	أستازانتين
Itaconic acid	حمض أيتاكونيك
Jacket side fouling film heat transfer coefficient	معامل الانتقال الحراري للغشاء المترسب على جانب الغلاف
Japanese encephalitis	التهاب الدماغ الياباني
J-chain (joining chain)	سلسلة-J (سلسلة الانضمام)
J-segment	قطعة-J (قطعة الانضمام)
Kanamycin	كنامايسين
Kilo base pair (kbs)	كيلو زوج قاعدي
Keratin	الكيراتين
Kinase	كيناز
Kinetic assay	معايرة حركية
Kinetic expressions	المقادير الجبرية الحركية
Kinetic modeling of Cell Growth	نَمذَجَة حركية لنموّ الخلايا
Kinetics	حركيات
Km	ثابت سرعة فعالية الأنزيم النصفية
Knock-out	منقوصة جين محدد
L- Aspartic acid	حمض الأسبارتيك -L
Labeled	موسوم، مُعلَّم
Labeled DNA or RNA probes	مسابر موسومة من DNA الـ أو الـ RNA
Labelled probe	مسبار موسوم
Laboratory containment conditions	شروط احتواء مخبرية
Lactams	اللاكتامات
Lactate	لاكتات

Lactating animals	الحيوانات الحلابة
Lactic acid	الحمض اللبني
Lactic acid bacteria	البكتيريا اللبنية
Lacton	لاكتون
Lactose	لاكتوز
Lag phase	طور الراحة
Lanthionines	لانثيونين
Lattice entrapment	الاحتجاز بالشبيكة
Leavening	تخمير
Legionella	الفيلقية
Lepidopteran	رتبة غمدية الأجنحة
Leukemia	لوكيميا
Levofloacin	الليفوفلوسين
Ligand	جزيء يتآلف ويرتبط مع آخر، رابط
Ligase	أنزيم لصق الـ DNA، ليغاز
Light chain	السلسلة الخفيفة
Light detection	استجلاء الضوء
Light microscope	المجهر الضوئي
Light-dark cycle	دورة الليل والنهار
Lignan	ليغنان
Lignin	ليغنين
Limiting substrate	المادة الأولية المُحدِّدة
Linear correlation	ارتباط خطي
Linear growth rate	معدل النمو الخطي
Linear polypeptide	ببتيدات متعددة خطية
Linear rate equations	معادلات النسب الخطية
Linear regression	الانحسار الخطي
Linear relation	علاقة خطية
Linearised	هيئته الخطية
Linkage	الارتباط

Linkage group	مجموعة ارتباط
Lipase	ليباز
Lipid bilayer systems	نظم دهون ثنائية الطبقة
Lipoproteins	البروتينات الدهنية
Liposomes	الليبوزومات، كريات دهنية ليبوزومية
Liquefaction	عملية التمييع
Liquid inlet jets	نفاثات دخول السائل
Liquor	شراب كحولي
Lithium acetate	أسيتات الليثيوم
Localized expression	تعبير موضعي
Logistic law	قانون المنطق اللوجستي
Long chain alkanes	ألكاين ذات سلسله طويلة
Low-shear impellers	الدافعات ذات الاحتكاك المنخفض
Lubricants	المخففة للاحتكاك
Luciferase	أنزيم تحليل لوسيفرين أو لوسيفيرايز
Luminometry	القياس الضوئي - لومينومتري
Lump	نُدبة
Lycopene	الليكوبين
Lyme disease vaccine	لقاح داء لايم
Lymphocytes	الليمفاويات
Lyophilised	المجفدة
Lysis	تحلل
Lysogenic cycle	حالة سبات أو حلقة مُنشِئة للإنحلال
Lysozyme	ليزوزايم
Lysyl residues	ثمالات الليزيل
Lytic cycle	حلقة انحلالية
Lytic nature	الطبيعة الحالة
Lytic phase	الطور الانحلالي
Maceration	عملية النقع، تعطين الكتان، تقطيع
Macrolides	الماكروليدات

Macromolecules	جزيئات كبيرة
Macronutreints	المغذيات الكبيرة
Macrophages	خلايا البلعمة الكبيرة
Maintenance coefficient	مُعامل الصيانة
Maintenance coefficient of compound «i»	مُعامل صيانة المُركَّب «i»
Malate	ماليت
Malate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من الماليت
Malate Synthase	أنزيم مُصنِّع ماليت
Malic acid	حمض الماليك
Malonate	مالونيت
Malted barely	شعير منقوع
Mannans	مانان
Mannases	ماناز
Mannitol	مانيتول
Mannosides	المانوزيدات
Marker	مؤشر
Marker gene	مورث أو جين مؤشر
Mash treatment	معالجة الهريس
Mass balances	توازن الكتل
Mass Balances for ideal bioreactors	توازنات الكتل في المفاعل الحيوي المثالي
Mass spcetrometry	قياس الكتلة الطيفي
Mass transfer coefficient	مُعامل انتقال الكتلة
Master cell bank hierarchy	تراتبية بنك خلوي رئيس
Master frozen culture	مزرعة مجمدة رئيسة
Mathematical models	نماذج حسابية
Matrix	قالب، مصفوفة
Measles	الحصبة
Measuring yields	قياس المحصول
Mechanistic	الميكانيستية

Mediated	بمساعدة، يساعد في عملية
Mediator	موسِّطاً
Mega-plasmids	بلازميدات عملاقة
Meiosis	الانقسام الاختزالي
Meiotic recombination	التأشيب الانتصافي
Membrane reactor	مفاعل الغشاء
Membrane-bound surface immunoglobulin	غلوبولين مناعي سطحي مربوط بالغشاء
Mesophilic organisms	الكائنات الحية المحبّة للحرارة المعتدلة
Messenger RNA	RNA رسول
Metabolic bottle neck	خانقات الأيض
Metabolic engineering	الهندسة الأيضية
Metabolic fingerprinting	تحديد بصمة الأيض
Metabolic Flux	تدفق الأيض
Metabolism	عمليات الأيض
Metabolites	مركبات ومنتجات الأيض
Metabolome	ميتابولوم
Metabolomics	دراسة الميتابولوم، ميتابولوميك
Metal chelate chromatography material	مواد كروماتوغرافيا خُلابية معدنية
Metastasis	انتقالات ورمية
Methanogenic bacteria	بكتيريا مولِّدة للميثان
Methanogens	عملية «المثننة»
Methanol	ميثانول
Methicillin	الميثيسيلين
Methyl	مثيل
Methyl ester	ميثيل الاستر
Methyl tertiary butyl ether	ميثيل ثلاثي البيوتيل الاثيري
MHC class I and class II	الصنف I والصنف II من مركبات التوافق النسيجي الرئيسية

Micelles	مُذيَّلات
Micobiota	الكائنات المجهرية الطبيعية الموجودة في الأمعاء أو في الوسط الحيوي
Micro organ	عُضيّات أو أعضاء صغيرة
Micro scale	مقياس دقيق
Microalgae	الطحالب المجهرية
Microarray	مصفوفة مجهرية
Microbial Cultures	زراعة الأحياء المجهرية
Microbial process	العمليات الحيوية الجرثومية
Microbiology	علم الأحياء المجهرية
Microcarrier	حوامل مجهرية
Microencapsulation	تغليفات دقيقة
Microenvronment	البيئة الدقيقة
Microfabrication	التصنيع المجهري الدقيق
Micromanipulation	التلاعب الدقيق
Micronutrients	المغذيات الدقيقة
Microprojectile bombardment	قصف بمقذوفات دقيقة
Microtiter plate	صفيحة مايكروتيتر
Microtubular structure	البنية الأنيبيبية
Microtubulin	الأنيبيبات
Mid-gut cells	خلايا المعي الوسطى
Mild conditions	شروط/ ظروف معتدلة
Minimizing the sum of squared errors	«تقليل مجموع تربيع قيم الخطأ»
Mis-folded	ملتف بصورة خاطئة
Mismatch repair system	نظام إصلاح الجدلات غير المتكاملة في الـ DNA
Mismatched blood transfusion	نقل دم غير موائم
Mitochondria	المتقدرات، الميتوكوندريا، السبحيات
Mitotic division	انقسام فتيلي أو خيطي
Mobilisable plasmids	بلازميدات مُحرَّكَة
Mobilization genes أو mob	جينات التحريك

Model	نموذج
Model's complexity	تعقيد النموذج
Modeling cycle	حلقة النَّمذجة
Modeling exercise	تمرين النمذجة
Modification enzymes	أنزيمات التغيير
Molar absorption coefficient	معامل الامتصاص المولي
Molar growth yield	«إنتاج النمو المولي»
Molar ratio	النسبة المولية
Molasses	السائل السكري
Molecular biology	علم الأحياء الجزيئية
Molecular genetics	الوراثة الجزيئية
Molecular size markers	مؤشرات الطول الجزيئي
Molecular weight marker	كمؤشر للحجم الجزيئي
Mono or dioxygenases	أنزيمات تضيف ذرة أو ذرتين من الأوكسجين
Monobactams	المونوبكتامات
Monoclonal antibody	الأجسام المضادة وحيدة النسيلة
Monogastric animals	حيوانات وحيدة المعدة
Monomers	مونوميرات (مكاثير احادية)
Monosaccharide	أحادي السكاريد
Monoterpenes	التيربينات الأحادية
Monoxygenase	المونوأوكسيجيناز
Morphogenesis	مرحلة تغيير في الشكل
Morphology	شكل (مورفولوجيا)
Multicellular organism cloning	استنساخ الكائنات المتعددة الخلايا
Multi-enzyme complexes	مركبات متعددة الأنزيمات
Multi-meric	متعدد الأجزاء
Multi-phase	متعددة الأطوار
Multiple antigen-binding sites	مواقع الربط بالمستضد المتعددة
Multiple clonning site (MCS)	مواقع الانتساخ المتعددة
Multiple nuclear polyhyrosis virus	فيروس نووي متعدد عديدات الهيدروسيس

Multiplicity of infection	تضاعف الاصابة
Multi-variant analysis	تحليل متعدد المتغيرات العشوائية
Mumps	أبوكعب
Muscat grape	العنب المسكي
Mutant complementation	تتام تكملة الطفرات
Mutant isolation	عزل الطافرات
Muteins	ميوتينات وهو بروتين مطفر بواسطة التقانة الحيوية
Mycelium	مايسيليوم
Mycoplasma genitalium	مايكوبلازما جينيتاليوم
Mycoplasmals	المفطورات
Myeloma	خلايا النخاع الورمية
Myelosuppression	كبت النخاع
Myxococcus xanthus	ميكسوكوكس زانثص
N-acetyl glucosamine	N- أسيتيل غلوكوزامين
NADPH	النيوكليوتايد الاميني الأدينيني الثنائي النيوكليوتايد الحامل للهيدروجين
n-alcane liquid	n ـ ألكين سائل
Naphthalene	النافثالين
Naproxen	نابروكسين
Narrow spectrum	ضيق الطيف
Native state	حاصلة أصلية طبيعية
Natural Gene Transfer	طرق نقل طبيعية للمورث أو الجين
Natural recombination	التأشيب الطبيعي
Natural selection	الانتقاء الطبيعي
Naturation	الحفاظ على طبيعتها، استعادة طبيعتها الأصلية
Necrosis	التنكرز
Negative selection System	منظومة الاختيار السلبي
Neisseria meningetidis	النيسرية السحائية
Nematode	ديدان بدائية نيماتودية

Neomycin	نيومايسين
Nested primers	بادئات تفاعل للتعشيش
Net formation rate	«معدل أو مقدار التكوين الصافي»
Neurosporene	نيوروسبورين
Neutropenia	قلة العَدِلات
Neutrophils	الخلايا العدلة السالفة
Newtonian	نيوتوني
n-glcosylation	ارتباط الغلايكوزيل بالآزوت
Niacinamide	نياسيناميد
Nickel	نيكل
Nicotinamide	نيكوتين أميد
Nicotinamide adenine dinucleotide	نيكوتيناًميد أدنين ثنائي النيوكليوتايد
Nisin	نيسين
Nitralase	النيترلاز
Nitrate	النايترات
Nitrilo triacetic acid-NTA	نايترلو ثلاثي حمض الخل
Nitrite	النايرايت
Nitrocellulose	نايتروسللوز
Nitrosoguanidine	نيتروزوغوانيدين
N-linked	مرتبط بالنيتروجين N
NMR	الرنين المغناطيسي النووي
Non encapsulated	بدون كبسولة
Non-aqueous solvents	مذيب غير مائي
Non-covalent	غير تشاركية أو غير تساهمية
Non-hodgkins lymphoma	ليمفوما لا هودجكينية
Non-ionic detergent	مواد التنظيف الغير أيونية
Non-limiting rate	غير مقيّد للسرعة (سرعة غير مقيدة)
Non-ribosomal synthetic pathway	مسار تصنيع غير ريبوزومي
Non-segregated	صفات متطابقة أي غير مقسمة إلى مجموعات
Non-steroidal anti-inflamatory drug	دواء مضاد للالتهاب غير ستيرويدي

Normal chemical rate constant	ثابت معدل كيميائي طبيعي
normalize	تسوية
Northern blotting	«بصمة نورثرن»
N-terminal Signal peptide	إشارة بيبتيد على طرف N
N-terminus	الطرف النتروجيني
Nuclease	نيوكلياز
Nucleases	أنزيمات مُحلِّلَة للحمض النووي - نيوكلياز
Nucleic acids	أحماض نووية
Nucleocapsid	قفيصة منواة
Nucleoid	نيوكليويد
Nucleophilic	منح للإلكترون
Nucleoprotein complexes	بروتينة مع أحماض نووية
Nucleosides	النيوكليوزايدات
Nucleosomes	نيوكليوسوم
Nucleotide	نيوكليوتيد
Nucleotide bases	قواعد نيوكليوتايدية
Nucleotide diphosphate kinase	أنزيم فسفرة نيوكليوتايد ثنائي الفوسفات
Nucleotide sequence	السلسلة النيكليوتيدية
Nylon	نايلون
Obligate bacterial parasites	بكتيريا مُجبرة على التطفل
Observed yield	العطاء الملاحظ
Occlusion bodies	أجسام إحاطة
Off-rate	معدل الفصل
Ofloxacin butyl ester	أوفلوكساسين بيوتيل الإستر
O-glycosylation	ارتباط الغلايكوزيل بالأوكسيجين
Oligonucleotide	سلاسل نيوكليوتايد قصيرة أوليغونيوكليوتيد، قليلات النيوكليوتيدات
Oligonucleotide-directed mutagenesis	طفرات موجهة لموقع باستعمال أوليغونيوكليوتايد
Oligosaccharides	قليلات السكاريد

On-rate	معدل التشغيل
Open reading frame (ORF)	إطار قراءة مفتوح
Operation of bioprocess	طريقة تشغيل العملية الحيوية
Operator gene	الجين المُشغِّل
Operon	أوبرون
Optical density	الكثافة الضوئية
Optimazation	توفير الظرف الأمثل والعوامل الأفضل
Optimize	أمثَلة
Order	درجة (ترتيب)، رتبة
Organelles	حجيرات أو عضييات
Organic acids	أحماض عضوية
Organic supplements	مضافات عضوية
Origin (of x, y-axis)	المركز، الأصل (نقطة المركز أو الأصل)
Origin of replication	موقع بدء التضاعف
Origin of transfer = OriT	موقع للإنتقال
Origin ori	نقطة بدء المضاعفة
Original single-site affinity	الألفة الأصلية للربط على صعيد موقعٍ واحد
Orotidine-5’ phosphate decarboxylase	أنزيم إزالة الكربوكسيل من أوروتيدين 5’ فوسفات
Oscillating electric field	حقل كهربائي متذبذب
Osmolarity	التناضح
Osmotic pressure	ضغط النَّضح
Osmotic shock	الصدمة التناضحية
Osmotic stabilizer	مُثبِّت نضح
Outflow	التدفق الخارج
Outlet	مخرج
Outlet flow	الجريان في المخرج
Outlet medium flow rate	معدل الجريان في المخرج
Output	خَرِج
Overhangs	أطراف ناتئة

Overlapping	متداخلة
Oxa cephams	الأوكزاسيفامات
Oxalate	أوكزالايت
Oxaloacetate	أوكزالوأستات
Oxazolidinones	الأوكزازوليدونونات
Oxidalive stress	مواد مؤكسِدة
Oxidant, oxidizing	عامل مؤكسِد
Oxidase	أوكسيداز
Oxidative conversion	التحويل بالأكسدة
Oxidative phosphorylation	تفاعلات الأكسدة والفسفرة
Oxo-functonality	الأداء الوظيفي oxo
Oxogluconate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من 2-اوكسوغلوكونات
Oxphos	عملية الأكسدة والفسفرة
Oxygen transfer	انتقال الأوكسيجين
Oxygenases	أنزيمات الاتحاد مع الأوكسجين
Oxygenated	مزود بالأوكسيجين
Oxygenation	اتحاد مع الأوكسجين
Oxytetracyclin	الأوكزيتتراسايكلين
Packed bed reactors	مفاعلات القعر المرصوص
Packing	رزم، رص
Palindromic	باليندرومك = تسلسل معكوس يُقرأ بنفس الطريقة على الجدلتين
Papain	البابابين
Parameter	معيار
Parameter estimation	تخمين قيم المعايير
Parameters	المعايير
Parent antibiotics	المضادات الحيوية الأصل
Parent cell	الخلية الأم
Parental myeloma	الخلايا الورمية النخاعية الأبوية
Particle	جُسيم

Partition coefficient	مكافئ التفرق
Passaging	عملية العبور
Passenger DNA	DNA راكب أو منقول
Passive diffusion	الانتشار السلبي
Passive immunity	المناعة السلبية
Patho mechanisms	آليات تطور الأمراض
Pathways engineering	هندسة مسارات التفاعل
PCR	تفاعل البوليميراز التسلسلي
Peak	قمة، ذروة
Pectinases	بكتيناز
penam	بينام
Penicillin acylases	بنسلين أسيلاز
Penicillins	بينيسيلينات
Penicillium chrysogenum	بنيسيليوم كريسوجينم
Pentamer	خماسي الأجزاء
Pentose C_5 Phosphates	فوسفات السكر الخماسي أو بنتوز فوسفات
Pentose phosphate »shunt«	«تحويلة البنتوز المفسفر»
Pentose phosphate cycle	حلقة تفاعلات فوسفات البنتوز
Pentose phosphate pathway	مسار فسفات السكر الخماسي
Peptidoglycan	البيبتدوغلايكان
Perfusion cultures	مزارع التنقيط
Peripheral blood	الدم المحيطي
Periplasmic space	المحيط البلازمي المجاور
Permeabilised cells	خلايا تم جعلها نفاذة
Permeabilization	تنضيح أو جعل الخلايا منفذة أو ناضحة
Permeable	نفوذة، قابلة للتناضح
Peroxidase/Catalase	بيروكسيدايز/ كاتاليز
Peroxidases	بيروكسداز
Peroxisome	بيروكسيسوم
pH gradient	تدرج في درجة الحموضة

Phage display libraries	مكتبات عرض العاثيات
Phagemid vectors	نواقل فاجمايد
Phagocytes	الخلايا البلعمية
Pharmaceutical	دوائي
Pharmaceutical industry	الصناعة الدوائية
Pharmacokinetics	الحركيات الدوائية
Pharmacophores	حوامل الخاصة الدوائية
Pharming	الزراعة الصيدلانية
Phase contrast	تعاكس الطور
pH-controlling agent	عامل ضبط الرقم الهيدرجيني
Phenanthrene	فينانثرين
Phenotype	الصفات الشكلية الخارجية النمط الظاهري
Phenoxy acetic acid	فينوكسي حمض الخل
Phenyl acetic acid	فينيل حمض الخل
Phenyl ethyl alcohol	كحول فينيل الايثيل
Phenylalanine	فنيل ألانين
Phenylpropanoid	فينيل البروبانويد
Phleomycin	فليومايسين
Phosphatase	أنزيم قطع (إزالة) الفوسفات
Phospho Fructokinase	أنزيم فسفرة فسفات الفركتوز
Phosphodiester	فوسفات ثنائي الإيستر
Phosphoenol pyruvate	فوسفواينول بايروفات
Phosphoenol pyruvate dehydratase	أنزيم مزيل للماء من الفوسفو اينول بايروفات
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	أنزيم فسفرة كربوكسيل الفوسفواينول بايروفات
Phosphofructokinase	أنزيم فسفرة فوسفوفركتوز، فوسفوفركتوكايناز
Phosphogluconate dehydaratase	أنزيم مزيل الماء من الفوسفوكلوكنات
Phosphogluconate dehydrogenase	أنزيم مزيل الهيدروجين من فوسفوغلوكونات
Phosphoglycero mutase	أنزيم فوسفو غليسيروميوتاس
Phosphoglycerol kinase	أنزيم فسفرة فوسفوغلسيرول
Phosphorylated	المفسفَر

Phosphorylation	الفسفرة
Phosphotyrosyl	فوسفوتايروسيل
bioreactors–Photo	المفاعلات الحيوية الضوئية
Photolithography	تفاعلات بالرسم الضوئي
Photoutotroph	ذاتية التغذي الضوئي
Phylogenetic relation-ships	العلاقات العرقية
Physical map	الخرائط الفيزيائية
Physiology	الفسلجة، علم الوظائف
Phytoalexins	الداحرات، الفيتوأليكسينات
Phytoanticipins	الفيتوأنتيسيبينات
Pi(Inorganic Phosphate)	فوسفور لاعضوي
Picoline	بيكولين
Piezophiles	المحبة للعيش تحت ضغط مرتفع
Pilot- plant	وحدات تصنيع تجريبية
Pipetting	سحب أحجام محددة، تسحيح
Pituitary tumour	ورم الغدة النخامية
Plant breeding	تهجين النبات التقليدي
Plant tissue culture	مزارع الأنسجة النباتية
Plant wastes	مخلفات النباتات
Plaque forming unit	وحدة تشكل اللويحة
Plasma	بلازما
plasma resonance	الرنين البلازمي
Plasmid	بلازميد
Plasminogen activator mutein	مفعّلات بلازمينوجين ميوتيني (مُطْفَر)
Platelets	صفيحات الدم
Ploidy	صيغة صبغية
Plug flow	انسياب مُقنَّن
Plug flow reactor (PFR)	مفاعل الانسياب المُقنَّن (المضبوط بالسدادة)
Pneumonia	الالتهاب الرئوي
Point mutation	تطفير موضعي أو نقطي

Polarity	استقطاب
Pollinators	الملقحات في غبار الطلع
Polluters	ملوثات
Poly A mRNA tail	ذيل متعدد الأدينين لـ RNA الرسول
Poly unsaturated	تعدد عدم الاشباع
Polyacetic acid	متعدد حمض الخل
Polyacrylate	بولي الأكريلات
Polyactide-polyglycolide	متعدد الأكتايد مع متعدد الغلايكولايد
Polyadenylation	عملية الأدنلة المتعددة
Polyclonal antisera	أمصال مضادة متعددة النسيلة
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	هيدروكربون عطري متعدد الحلقات
Polyenes	البوليئينات
Polyethylene glycol (PEG)	بولي إثيلين كليكول
polyhydrosis	عديدات الهيدروسيس
Polyketides	عديدات الكيتايدات، بوليكيتايد
Polypeptide	عديدة الببتيد
Polyphenols	البولي الفينول، عديد الفينول
Polyploidy	التعددية الصبغية
Polysaccharides	عديدات السكاريد، السكريات المركبة المعقدة
Polysaccharides	السكريات المركبة المعقدة
Polyunsaturated	ذو روابط مزدوجة متعددة
polyunsaturated fatty acids	أحماض دهنية غير مشبعة متعددة
Polyurethane	بولي يوريثان
Poly-butyrate	بولي هيدروكسي بيوترات
Pooled blood products	منتجات الدم المجمعة
Population	مجتمع، سكان، تجمع حيوي
porous	مسامي
Porphyrins	بورفايرين
Positive effector	مُحَفِّز إيجابي

Post recovery processing	معالجات ما بعد الاسترجاع
Post-transcriptional modifications	تعديلات ما بعد النسخ
Potency	فعالية
clinical studies–Pre	دراسات قبل سريرية
Precursors	مركبات سالفة
Pre-mix	خليط محضر مسابقاً
Primary screening	غربلة أولية
Primary transcript	منسوخات أولية
Primate neural	خلايا الرئيسيات العصبية
Primer extension analysis	تطويل بادئ التفاعل
Primer oligonucleotides	أوليغونيوكليوتايد بادئ التفاعل
Primers	مادة بادئة، مهايئ
Prions	البريونات
Pro insulin	بادئة الانسولين
Probability	احتمال
Probes	مجسات، مسابر
Prochem	بروخم
Procursor metabolites	مركبات أيض أو مستقلبات سالفة
Product formation kinetics	حركيات تشكيل المنتج
Productivity	الإنتاجية
Products	الناتجات، نواتج التفاعل
Profile	سيماء، مظهر
Programmed cell death	الموت الخلوي المبرمج
Pro-inflammatory mediator	وسيط بادئ الالتهاب
Prokaryotic	خلايا ذات نواة أولية
Proline	برولين
Promoter	مُحِضّ، مُشجع
Proofreading	القراءة التصحيحية
Propane g	بروباين غاز
Propanediol	بروباين ديول

Propanoic acid	حمض بروبيونيك
Propanol	بروبانول
Prophage	عاثية أولية أو بروفايج
Propionate	بروبيونات
Propionibacterium	بكتيريا بروبيوني
Propionic	بروبيونك
Propodium iodide	أيوديد البروبوديوم
Proportional	متناسب، تناسبي
Pro-sequence	التسلسل الأولي
Protease/proteolytic enzyme	أنزيم محلل للبروتين، بروتياز
Protein aggregation	تكتل البروتينات
Protein carriers	حوامل بروتينية
Protein fusion	اندماجات بروتينية
Protein kinase	أنزيم فسفرة البروتين أو بروتين كايناز
Protein sequencing	سَلسَلة البروتينات
Protein-DNA binding assays	اختبارات ارتباط البروتين مع الـ DNA
Protein-encoding genes	مورثات أو جينات تحمل شفرة البروتينات
Proteolysis	التحلل البروتيني
Proteolytic fragment	شدفة ناتجة جراء التحلل البروتيني
Proteome	بروتيوم- مُجمل بروتينات الخلية
Proteomic	دراسة البروتيوم - بروتيوميك
Protocol	بروتوكول
Proton motive force (PMF)	قوة البروتون للتفعيل، الجِبْلات المُجردة
Protoplast	بروتوبلاست
Pseudogene	جين كاذب
Pseudoplastic fluids	سوائل زائفة المطاوعة
Psychrophilic	المحبة لدرجات الحرارة المنخفضة أو للبرودة
Pulp	عجينة الورق/ اللباب
Pulse naturtion	حفاظ على الشكل الطبيعي بأسلوب نبضي
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	الرحلان الكهربائي في الحقل النبضي

Pumice stone	حجر الخفان
Purines	بيورين
Purity	نقاء
PutativeProtein	بروتين مفترض
Pyranoses	بيرانوز
Pyrimidine	بايريميدين
Pyrophosphate PPi	بايروفوسفات غير عضوي
Pyrovate	بيروفات
Pyruvate carboxylase	أنزيم إضافة الكربوكسيل للبايروفات
Pyruvate dehaydrogenase	أنزيم المزيل للهايدروجين من البايروفات
Pyruvate kinase	أنزيم فسفرة البايروفات
Pyruvate-formate lyase	أنزيم تحليل البايروفات- فورمات
Pyruvic acid	حمض البايروفيك
Racemic	راسيمي
Radial flow rushton turbines	توربينات ذات انسياب شعاعي
Radioactivity	النشاط أو الفعالية المشعة
Radioimmunoassays	المعايرات المناعية المشعة
Radiolabelled	موسوم بمشع
Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)	
Range	نطاق، مدى، مجال
Rate	نسبة أو سرعة أو معدل
Rate equations	معادلات النسبة
Rate limiting	مقيِّد السرعة
Rate-limiting step	يقوم بتحديد أو إبطاء سرعة التفاعلات التالية
Reactants	متفاعلات
Reactive reagents	كواشف أو مواد ومركبات متفاعلة
Reactor-adapted membranes	أغشية متأقلمة مع المفاعل
Reading frame	إطار القراءة
Reagents	مواد التفاعل، الكواشف

Real time PCR (RT-PCR)	الـ PCR بالوقت الحقيقي
Real-time information	معلومات وقت حصولها
Receptor	مستقبل
Recessive	متنحي
Reciprocal	تبادلي
Recircularisation	إرجاع إلى شكل دائري
Reckettisial infections	الالتهابات الريكيتيسية
Recombinant	مأشوب
Recombinant DNA	DNA مأشوب
Recombination	تأشيب
Recovery	استرجاع
Redox	تفاعلات اختزال وأكسدة، خزلدة
Redox half reaction	تفاعل الأكسدة والاختزال أو الخزلدة النصفي
Reducing	عامل مُختزِل
Reducing power	طاقة مُختزِلة
Reductant	مواد مُختزِلة
Reductase	ريدكتاز
Reduction	الاختزال
Redundant codons	شفرات مكررة
Reference compounds	مركبات المُعتمدة كمرجع
Refraction properties	خصائص انكسار الضوء
Regenerative medicine	الطب التجديدي
Regime analysis	تحليل النظام
Regioselectivity	انتقائية موقعية
Regulatory and safety aspects	المظاهر الرقابية والأمانية
Regulatory genes	الجينات التنظيمية
Regulatory protein	بروتينات الضبط والتنظيم
Regulons	تجمع مورثات ذات ضبط مشترك
Reinforced core particles	جسيمات مقواة من الداخل
Relapsing-rimitting (MS)	المتعدد اللوحي الناكسي المتراخي

Rennet	مِنفَحة
Reoxidation	إعادة أكسدة
Replication	تضاعف – المضاعفة
Replication fork	شعبة للمُضاعفة
Replication origins	مواقع أو نقاط بدء التضاعف
Replicative	قابل للمضاعفة
Reporter gene	جين مُخبِر
Reporter genes	جينات الاخبار
Repressor	كابت، كابح، حابس
Repressor binding site = operator	موقع ارتباط المُثبِّط
Reproducible	متناتج، متكاثر، قابل للتكاثر
Residence time	وقت البقاء
Residues	ثمالات، بقايا
Resins	الراتنجات، «ريزين»
Respiratory chain	سلسلة نقل الإلكترون (سلسلة التنفس)
Respiratory quotient = RQ	حاصل التنفس
Respiratory syncytal virus	فيروس الالتهابات التنفسية والدماغية
Resting cells	خلايا في طور الراحة
Restricting	يقيد، يحصُر، يحجز
Restriction endonucleases	إندونيوكلياز حصري
Restriction enzyme	أنزيمات التقييد أو الحصر
Restriction enzyme-mediated integration (REMI)	اندماج مُساعَد بنزيمات الحصر
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)	نمط الشرائط الناتج عن عملية هضم أو قطع الـ DNA بالأنزيمات الحصرية
Restriction maps	خرائط حصرية
Restriction Site	موقع حصري
Retro-biosynthetic approach	مقاربة التصنيع الحيوي التراجعي
Retrovirus vaccine	لقاح فيروس العجلية
Reverse glycolysis	عملية تكسير السكر المعكوسة

Reverse transcriptase	الناسخ العكسي
Reversed electron transport	نظام نقل الإلكترون عكسياً
Reversible	منعكس
Rheology	خصائص سريان الوسط الزرعي السائل
Rheumatoid arthritis	التهاب المفاصل الريثاني
Ribonuclease	ريبونيوكلياز
Ribose	ريبوز
Ribosomal RNA	RNA الرايبوزومي
Ribosomal synthetic pathway	مسار تصنيع ريبوزومي
Ribosome binding site	موضع اتصال (ارتباط) الريبوزوم
Right angle light scatter (RALS)	تشتت الضوء بزاوية قائمة
Ripened	ناضج، معتق
RNA dependent-DNA polymerase	أنزيم بلمرة DNA يعتمد على قالب من الـ RNA
RNA polymerase	أنزيم بلمرة RNA، بوليمراز الـ RNA
RNAi	الـ RNA المتدخل
Robotic printer	طابعة آلية
Robotics	روبوتي
Roller bottles	قوارير جهاز البكرات (الدحرجة)
Rotary vaccum filter	مرشح دوار في الفراغ
synonymous codon usage = RSCU Relative	استعمال شفرة ما ومرادفاتها
Rule of thumb	قاعدة الإبهام
Rushton disc turbines	توربينات قرص روشتون
S-2 Chloropropionic acid	S-2 حمض كلوروبروبيونيك
Saccharide acceptors	قابلات السكاريد
Saccharification	الاستخلاص الصناعي للسكر، تحويل الكربوهيدرات المعقدة إلى سكر
Salicylate	ساليسيلات
Salmonella	سلمونيلا
Sandia virus	الفيروس سانديا

Saprophytic	يعيش على المادة الميتة أو العفنة
SARS	المتلازمة التنفسية الحادة
Saturated fatty acyl	حمض شحمي مشبع
Scale down approach	مقاربة تخفيض الإنتاج
Scale-up	زيادة الإنتاج
Scattered light	الضوء المتشتت
ScFv (single chain Fv fragment)	شدفة Fv المنفردة السلسلة
Schiff base	قاعدة Schiff
Screen for	غربل، يبحث عن
Scurvy	داء الأسقربوط
Secondary immune response	استجابة المناعة الثانوية
Secondary metabolism	الأيض (الاستقلاب) الثانوي
Secondary metabolites	المستقلبات الثانوية
Secondary screening	غربلة ثانوية
Secondary structures	بنية ثانوية
Secretion vectors	نواقل الإفراز
Segregated	انفصالي
Selectable Marker gene	جين واسم قابل للانتقاء
Selection marker	واسم انتقاء
Selective pressure	ضغط الانتقاء
Self-tolerance	التحمل الذاتي
Semi-batch	نصف الدفعات
Semi-permeable membrane	غشاء شبه أو نصف منفذ
Semi-synthetic	شبه أو نصف تصنيعي
Sense	اتجاه إعتيادي
Sepabeads	حبيبات Sepa
Separation factor	عنصر التفريق
Sepharose	السيفاروز
Sepsis	تعفن الدم
Sequencing	سَلسَلة

Serine	سيرين
Serum	مصل الدم، مصل
Sesquiterpenes	السيسكيتيربنات
Set-up	إعداد
Shake flask	دورق هزاز
Shear forces	قوى الجز
Shelf-life	فترة صلاحية
Shift	تحول (انزياح)
Shoots	الفروع
Shotgun cloning	الانتساخ الطلقي
SH-sugars	السكريات المرتبطة بمجموعة الثايول
Shuttle or bifunctional vectors	نواقل مكوكية أو ثنائية الوظيفة
Shuttle vector	ناقل مكوكي
Side chains	السلاسل الجانبية
Sigmoidal	سيغمويدي
Signal peptide	إشارة ببيتيدية
Signal sequence	تسلسل الإشارة
Signaling	عمليات التأشير
Silica	هلام السيليكا
Silicates	سيليكات
Silicon	سيليكون
Similium	خباب من نوع الذلقاء
Simple photometric adsorbancy measurement	قياس بسيط ادمصاصي بواسطة مقياس ضوئي
Simulation	محاكاة
Single cross-over recombination	تأشيب تقاطعي أو تصالبي منفرد
Single Stereospecific hydroxylation	عملية واحدة من الهدرجة النوعية الفراغية
Single valency	وحيد التكافؤ
Single-chain precursor	الجزيء السالف وحيد السلسلة
Single-site mutations	الطفرات الموضعية

Single-stranded	أحادي الجديلة
Sinusities	التهاب الجيوب
Site direct mutagenesis	التطفير الموجه في الموقع
Site-specific cross-over	تقاطع أو تصالب في مواقع محددة
Site-specific integration/excision	استئصال ودمج في موضع محدد
Site-specific transposition	التبديل في الموقع المحدد
Sitosterol	سيتوستيرول
Small scale	على نطاق مصغر
Smear	لطخة
Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	رحلان كهربائي في هلام بوليأكريلاميد مع SDS
Software	البرامج الحاسوبية
Solid support	مسند أو داعم صلب
Solidification	تصليب
Solubility	انحلالية
Somatic cells	خلايا جسمية أو جسدية
Somatic mutation	تطفير جسمي
Somatic re-arrangements of the genes	عمليات إعادة ترتيب جسدية للجينات
Somatotropin	السوماتوتروبين
Sorbitol	سوربتول
Southern blotting	«وصمة ساوثرن»
Spacers	مباعدات
Sparging	عملية ضخ الهواء
Special combination	توليفة خاصة
Species	نوع
Specific	نوعي، خاص، محدد
Specific aldolase	أنزيم الدوليز محدد
Specific conversion rate of compound i	سرعة التحويل النوعي للمركب «i»

Specific growth rate	معدل النمو النوعي
Specific substrate uptake rate	معدل الامتصاص النوعي للمادة الأولية
specificity	نوعية (تخصص/ انتقائية)
Spectrometry	القياس الطيفي - سبكترومتري
Spectrophotometer	مقياس الطيف، المطياف الضوئي
Spent medium	الوسط المستنفذ
Spinner flask	دوارق دوارة
Splicing	عملية القطع والوصل
Spodoptera frujiperd	دود الخريف من فصيلة حرشفية الأجنحة
Spore	البوغة
Spores	أبواغ
Sporulation	التبويغ
ST Louis	التهاب سانت لويس الدماغي
Stabilizers	مثبتات
Staining	تبقيع، تلوين
Standard	المقياس، قياسي، معياري
Standard composition	تركيب نمطي معياري
Standard enthalpy of formation	طاقة التكوين الداخلية (إنثالبي) المعيارية
Standard Gibbs energy of formation	طاقة «جبس» المعيارية للتكوين
Standards and controls	المقاييس والضوابط (الشواهد)
Start codon	شفرة البداية
Stationary phase	طور السكون
steady-state continuous-cultures	الزراعة المستمرة والمستقرة
Stereoselectivity	انتقائية فراغية
Steric effect	تأثيرات الشكل والفراغية
Steric hindrance	العائق الفراغي
Steroids	الستيرويدات
Sterol	ستيرول
Stimulons	تجمع مورثات ذات تحفيز مشترك
Stirred tank reactor	مفاعلات (ذات أحواض) مزودة بخلاطات

Stoichiometric coefficient	مُعامل قياس رياضي أو مُعامل ستوكيومتري
Stoichiometric production	إنتاج متكافئ
Stoichiometry	قياس تناسب العناصر في التفاعل - ستوكيومتري
Stop codon	شفرة التوقف
Strain improvement programs	برامج تحسين السلالة
Strains	سلالات
strand	جديلة، شريط
Streptococci	المكورات العنقودية
Streptococcus pneumoniae	العقدية الرئوية
Streptococcus pyogenes	العقدية المقيحة
Streptogramins	الستريبتوغرامينات
Structural function	وظيفة هيكلية أو بنيوية
Structural gene	جين بنيوية
Sub-class	الصنف الفرعي
Sub-cultures	زراعات مرحلية
Submerged culture	مزرعة مغمورة
Submerged fermentation process	عملية تخمير منغمرة
Suboptimal	أقل من المستوى المثالي
Substituted phenol	الفينول المستبدل
Substrate	المادة الأولية، مركب أولي، الركيزة
Substrate concentration gradient	تحدر في تركيز المركب الأولي
Substrate maintenance coefficient	مُعامِل صيانة المادة الأولية
Substrate-level phosphorylation	تفاعلات الفسفرة على مستوى المواد الأولية
Substructure	قوام
Subtilisin	السبتيليزين
Sub-type	نُمَيْط
Succinate	سكسينات
Succinate dehydrogenase	أنزيم مزيل هيدروجين من السكسينات
Succinate thiokinase	أنزيم فسفرة كبريتية للسكسينات
Succinic acid	حمض سكسينيك

Succinyl-coA	سكسينيل كوA
Sucrose	السكروز
Sugar over-flow metabolism	أيض السكر المفرط الجريان
Sulphate ion	أيون السلفات
Sulphate reducing bacteria	بكتيريا مختزلة للسلفات
sulphide ion	أيون اسلفايد
Sulphite	سلفيت
Sulphonamides	السلفون أميدات
Sulphydryl group	مجموعة الكبريت
Supercoiling	حلزنة والتفاف الـ DNA على بعضه البعض، فائقة الالتفاف
Super-critical fluids	السوائل فوق الحرجة
Supernatant	الجزء الطافي
Surface immunoglobulin	الغلوبولين المناعي السطحي
Surface tension	التوتر السطحي
Surfactant	مخفضات الشد أو التوتر السطحي
Surrogate host microorganism	كائنات مجهرية مضيفة بديلة
Suspension	معلق
Suspension cultures	مزارع معلقة
Sustainability	الاستمرارية والبقاء
Switch to	تتحول
Synteny	التزامل
synthetic gene	جين مصنَّع
Synthons	السينثونات
Syrups	عصائر
Systems biology	علم الانظمة البيولوجية
Tagging	تأشير، وسم
Tandem	متتابعة متعاقبة
Tangential Flow	سريان أو تدفق عرضي
Tansglycosidation	نقل الغلايكوزيل

Taq polymerase	أنزيم البلمرة «تاك»
Target DNA	الـ DNA المستهدف
Tartrate	تارترات
TATA box	«صندوق تاتا»
TCA	دورة حمض الليمون
T-cell antigen-specific recognition	تعرف نوعي بالمستضد من قبل الخلية التائية
T-cells	الخلايا التائية
Telithromycine	تليثرومايسين
Temperature correction	مُعَدِّل أو مُصحِّح الحرارة
Temperature-stable	ثابت حرارياً
Template	عارضة، قالب
Tension	التوتر
Teratogenic	مُشوِّه
Terminal alkenes	الألكينات الطرفية
Terminal nucleotide sequence	أطراف تسلسلات نيوكليوتايدية
Terminator	منهّي
Tern over	تحول
Terpenoids	تيربينويدات
Tertiary structure	البنية الثالثة
Tetanus vaccine	لقاح الكزاز
Tetracyclines	التيتراسايكلينات
Tetrahydrofuran	رباعي الهيدروفوران
Tetrapoid	رباعي الصيغة لبصبغية
Tetrasccharides	رباعيات السكاريد
Tetrose C_4 Phosphate	فوسفات السكر الرباعي- تيتروز فوسفات
Therapeutic index	الدليل العلاجي
Thermocycler	آلة الـ PCR
Thermodynamic	الديناميك الحراري
Thermophiles	المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة
Thermostability	الثباتية الحرارية

Thioester	ثايوإيستر
Thiosulphate ion	شاردة ثايوسلفات
Third-degree polynomial equation	معادلة متعددة الحدود من الدرجة الثالثة
Threonine	ثريونين
Thrombin	ثرومبين
Thymine	ثايمين
Time-lapse movie	فيلم مقتصر
Tissue plasminogen activator(tPA)	مفعّل البلازمينوجين النسيجي
Titers	تركيز المنتج
Tonic	منشط
Topoisomerase	أنزيم توبويزمرايز
Topology	الشكل الطوبولوجي
Top-spray	بخاخات علوية
Totipotency	القدرة على التشكيل
Toxic substances control act (TSCA)	قانون التحكم بالمواد السامة
Toxicity	السُمِّية
Toxin	مواد سامة
T-phages	العاثية T
Transcription	النسخ
Transcription factor	عامل نسخ
Transcription initiation site	موقع بدء النسخ
Transcription terminator	مُوقِفُ (إشارة وقف) عملية النسخ - إشارة إنهاء النسخ
Transcriptional complex	مركب أو مجمع نسخي
Transcriptional maps	خرائط نسخية
Transcriptional profile	النمط النسخي
Transcriptional reporter	مخبر «نسخي»
Transcriptional start point = tsp	نقطة بداية النسخ
Transcriptional units	وحدات نسخ
Transcriptome	ترانسكوبتوم

Transducing particles	جُسيم مُنبِّغ
Transductant	المُنبَّغ
Transduction	التنبيغ
Transduction pathway	مسارات انتقال الإشارات
Trans-esterification	توزيع الجزيئات التبادلي
Transfection	التعداء
Transformant	الخلايا المُحورة التي تلقَّت الـ DNA، المتحولات
Transformation	التحويل
Transformation genetic	تحويل وراثي
Transformation vectors	نواقل التحويل
Transgenic	محوَّر
Transgenic animals	الحيوانات المحورة وراثياً
Transition metal	الفلز المتحول
Transketolase	ترانس كيتولاز
Translation	ترجمة
Translation signal	إشارة بدء الترجمة
Translation start codon	شفرة بدء الترجمة
Translocase	جهاز الإفراز ترانسلوكاز
Translocon	آلة انتقال أو ترانسلوكون
Transmembrane domains	قطاعات بروتينية داخل الغشاء
Transplant rejection	رفض الجسم للأعضاء المزدرعة
Transponation	الاستجابة
Transport systems	نظام النقل
Transposon	عوامل وراثية مُتنَقِلة - ترانسبوزون
Triacylglycerols	ثلاثيات أسيل الغليسيرول
Tricarboxylic acid cycle	حلقة حمض ثلاثي الكربوكسيل
Trichoplusa ni	حشرة دودة الملوف القياسة
Triose phosphate isomerase	أنزيم إيزوميراز فوسفات الترايوز
Triterpenes	التيربينات الثلاثية
tRNA	جزيء الـ RNA الناقل

Tropan alkaloids	ألكلويدات التروبان
Tropophase	مرحلة التغيُّر، متعددة الأطوار
Tryptic product	منتجات افتراضية لقطع نظري بواسطة تريبسن
Tryptophan synthetase	سينثاتاز التريبتوفان
Tufits	مركز تافتس
Tumour-associated antigen	المستضد المترافق للورم
Turbidostat	التربيدوستات
Turbulance	العصف
Turnover	دورة تصنيع-تكسير - دورة انقلاب
Two-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAG)	رحلان كهربائي ذو بعدين أو اتجاهين
Two-site ELISA	تقنية ELISA ذات الموقعين
Tylosin	التيلوسين
Type I diabetes	داء السكري من النوع 1
Tyrocidins	التيروسيدينات
Tyrosine	تايروسين
Ultra filtration	ترشيح فائق، فلترة فائقة
Ultrasonic	موجات فوق صوتية
Unbaffled stirred bioreactor	مفاعلات حيوية مزودة بخلاطات منظِّمة للانسياب
Undifferentiated	غير متمايزة
Unprotonated compound	المركب بالشكل المُزال منه البروتون
Unsaturated fatty acyl	حمض شحمي غير مشبع
Unstructured model	النموذج الغير بنيوي
Upstream	في موقع سابق
Upstream activation sequence (UAS)	التسلسل المُحفز في أعلى الموقع
Upstream repression sequence (URS)	تسلسل مثبط في أعلى الموقع
Upward-pumping axial flow turbine	توربينة ذات الانسياب المحوري والضخ الموجه إلى أعلى
Uracil	يوراسيل

Urea	يوريا
Urease	اليورياز
Uridine	يوريدين
Vaccinia virus	فيروس الفاكسينيا
Vacuole	حويصلة
Van der Waal forces	قوى van der Waal
Vancomycin	فانكومايسين
Vector	ناقل
Vector-based antibiotic resitance gene	مورث مقاومة المضادات الحيوية الموجود في الناقل
Vegetative	نمو نباتي
Verbal	نوعي لفظي
Vesicular transporter	نقل بالحويصلات
V_H	V_H (قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الثقيلة)
Video/Photomicroscopy	تصوير الفيديو المجهري
Vinyl alcohols	فنيل الكحول
Vinyl pyrrolidone	فنيل البايروليدون
Viral particles	جسيمات فيروسية
Viral plaque	صفيحة فيروسية
Virginamycine	الفيرجينامايسين
Virulence genes (Vir genes)	جينات مُمرِضة
V_L	V_L (قطاع المنطقة المتغيرة من السلسلة الخفيفة)
Volumetric formation rate	معدل التكوُّن الحجمي
Volumetric productivity	الإنتاجية الحجمية
Volumetric productivity	الإنتاجية الحجمية
Volumetric rate	المعدل الحجمي
Vortexing	إحداث الدوامات
V-region (variable region)	المنطقة-V (المنطقة المتغيرة)
V-segment	القطعة-V
Warping software	برامج حاسوبية للمطابقة

Washed out	زال
Water activity	فعالية مائية
Well-defined	دقيق
Western blot	التسرب اللطخي بطريقة ويستيرن، «وصمة ويسترن»
Wild type	نوع بري طبيعي
Wine stabilization	توازن قوام النبيذ
Wood pulp	لباب الخشب
Working stock culture	مخزون المزارع التي ستستخدم في الإنتاج
Wort	نقيع
Xenoimmunisation	التمنيع التهجيني
Xenotransplantation	زرع أعضاء من جنس مختلف أو زينوترانسبلانتايشن
X-ray	الأشعة السينية
X-ray diffraction	انحراف الأشعة السينية
Xylan	الزيلان
Xylanase	الزيلاناز
Xylose	زايلوز
Yeast artificial chromosomes (YAC)	كروموزوم الخميرة الاصطناعي
Yeast one-hybrid system	منظومة التهجين المنفرد للخميرة
Yeast two-hybrid system	منظومة التهجين الثنائي في الخمائر
Yield	عطاء، محصول
Yield coefficient of biomass per substrate, incl. maintenance	مُعامل عطاء الكتلة الحيوية لكل مادة أولية، مُتضمّناً عطاء البقاء
Yield exclusive maintenance	باستثناء عطاء البقاء
Yield of biomass x on compound «i»	محصول الكتلة الحيوية «x» على المُركَّب «i»
Zithromax	زيثروماكس
ZnS	كبريت الزنك
α-amylases	α أميلاز
α-helix	شكل لولب
β - galactosidase	أنزيم تحليل الكالاكتوز = β -كلاكتوسيدايز

β - lactamase	أنزيمات بيتا لاكتاماز
β - cellooligosaccharides	قليلات السكر السيلولوزية المترابطة بروابط بيتا- 4،1
β - lactam	بيتا-لاكتام
β - oxidation	تفاعلات الأكسدة «بيتا»
β - sheets	صفائح- β

فهـــرس

ـ ب ـ

ـ ت ـ

ـ ث ـ

ـ ج ـ

- ح -

- خ -

- ز -

- س -

ـ ش ـ

ـ ص ـ

ـ ض ـ

ـ ط ـ

ـ ظ ـ

ـ ع ـ

ـ غ ـ

ـ ف ـ

ـ ق ـ

ـ ك ـ

ـ ل ـ

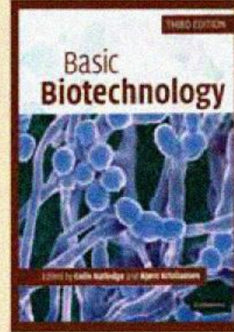
ـ م ـ

- ن -

ـ هـ ـ

- و -

أسس التقانة الحيوية(*)



(*) الكتاب الثالث من التقنية الحيوية

سلسلة كتب التقنيات الإستراتيجية والمتقدمة

1. المياه
2. البترول والغاز
3. البتروكيمياء
4. النانو
5. التقنية الحيوية
6. تقنية المعلومات
7. الإلكترونيات والاتصالات والضوئيات
8. الفضاء والطيران
9. الطاقة
10. المواد المتقدمة
11. البيئة

السلسلة: تضم هذه السلسلة ترجمة لأحدث الكتب عن التقنيات التي يحتاج إليها الوطن العربي في البحث والتطوير ونقل المعرفة إلى القارئ العربي.

الكتاب: أصبحت التقانة الحيوية واحدة من أهم تقانات القرن الحادي والعشرين وتمتد نشاطاتها، المتعددة الاختصاصات، من تقنيات DNA المأشوب، والكلونة واستخدام الزراعات الجرثومية والخلوية، إلى إنتاج ردح هائل من المنتجات، ابتداءً من الخبز إلى المضادات الحيوية. ولاتزال هذه التقنية تبتدع علاجات لأمراض عديدة، وتمدّ لتجهيز تقنيات لمقارعة المشاكل البيئية.

يجمع كتاب أسس التقانة الحيوية "بتفرد كلٌ من علم البيولوجيا ومواضيع السيرورات الحيوية، لوضع صورة كاملة حول التقانة الحيوية، فهو يفسر المبادئ الأساسية المشتركة، ويوفر أمثلة شاملة لتوضيح كيفية تطبيق هذه المبادئ، ابتداءً من المادة الأولية حتى المنتج النهائي. ومن الأوجه المتميزة لهذا الكتاب مناقشة رأي العموم حيال التقانة الحيوية ومفاهيمها وأخلاقيتها، ما يضع هذا العلم بشكله المفتوح أمام الجماهير.

يُعَدُّ الكتاب بأسلوبه الميسّر وغزارته العلمية والمفاهمية ضرورياً لكافة طلاب وممارسي هذا الاختصاص الموسوعي، بالإضافة إلى الباحثين والصناعيين.

المؤلفان: كولن رتليدج: استاذ التقانة الحيوية المتمرس في قسم العلوم البيولوجية – جامعة هَلّ، المملكة المتحدة.

بيورن كريستينسين: الرئيس التنفيذي للهيئة الاستشارية الأوروبية للتقانة الثانوية في النرويج. عضو فاعل في اتحاد التقانة الحيوية FEB، ومؤسس ورئيس هيئة علوم الهندسة البيولوجية.

المترجمون: ابتسام عبد الجبار: دكتوراه (مناعة)، جامعة كوينزلاند– استراليا، مديرة مختبرات FACS في معهد داياقتينا للسرطان.

غالب البكري: دكتوراه (ميكروبيولوجيا جزيئية)، جامعة أدنبرة، باحث في Engenel C Pty سيدني، استراليا

إياد غانم: دكتوراه (بيولوجيا)، جامعة ريدنغ، رئيس فرع علم السموم لقسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية، جامعة دمشق – سورية.





المنظمة العربية للترجمة

الثمن: 86 دولاراً
أو ما يعادلها



ISBN 978-9953-82-492-5